

**Lymphozyten-Subpopulationen bei Infektionen
sowie primären und sekundären Immundefizienzen
im Kindesalter**

Reinhard Modrow

1978

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr.med. Klaus Betke

Lymphozyten-Subpopulationen bei Infektionen
sowie primären und sekundären Immundefizienzen
im Kindesalter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Reinhard Modrow

aus

Sonthofen

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr. W. Marget

Mitberichterstatter: Prof.Dr. K. Betke

Dekan: Prof.Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 1978



Meiner Mutter

Inhaltsangabe

	Seite
I. Einleitung	
T- und B-Lymphozyten	1
In vitro Charakterisierung und Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen	2
Fragestellung	3
II. T- und B-Lymphozyten	
1. Ontogenese der T- und B-Lymphozyten und ihre Aufgabe bei der Immunantwort	4
2. Membraneigenschaften von Lymphozyten- populationen und Rezeptortheorien	12
III. Material und Methode	
1. Verwendete Reagenzien	18
2. Durchführung des Testes	19
3. Patientengut	22
4. Versuchsbedingungen	23
IV. Ergebnisse eigener Untersuchungen	
1. Kontrollgruppe	25
2. Kinder mit bakteriellen Infektionen	26
3. Kinder mit Virusinfektionen	28
4. Kinder mit primär nicht infektiösen Krankheiten	28
V. Ergebnisse anderer Untersucher; Analyse und Vergleich	
1. Methodische Varianten; Ergebnisse bei Gesunden	33
2. Patienten mit bakteriellen oder viralen Infektionen	38
3. Patienten mit malignen Erkrankungen	40

4. Patienten mit Immundefizienzen	41
5. Andere mit dieser Methode untersuchte Krankheiten	42
VI. Diskussion	
1. Diskussion der Ergebnisse eigener Untersuchungen	44
2. Quantitative Untersuchungen von Lymphozytenpopulationen und ihre Bedeutung für die Klinik	51
3. Die Brauchbarkeit des "Rosetten-Tests" zur Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen	53
VII. Zusammenfassung	54
VIII. Anhang	
Tabellen I - VI	57
IX. Literaturverzeichnis	65

I. Einleitung:

Der Lymphozyt, einst verstanden als Endzelle mit konstanter Morphologie und Funktion, rückte bei der Erforschung der Immunantwort mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Innerhalb dieser immunkompetenten, das heißt, antigensensitiven und -reaktiven Zellgruppe kann man zur Zeit mindestens zwei Teilgruppen unterscheiden, denen unterschiedliche immunologische Funktionen zugeschrieben werden.

Die zellvermittelte Immunität ist eine Leistung der sogenannten T-Lymphozyten. Vor allem bei der Antigenerkennung, bei bestimmten Formen der Infektionsabwehr, bei der Immunität vom verzögerten Typ, bei Transplantatabstoßung und wahrscheinlich auch der Kontrolle über Tumorenentstehung treten diese Lymphozyten in den Vordergrund. Ihr morphologisches Substrat ist die mononukleäre Infiltration (8). Die mit Serum oder antikörperproduzierenden Zellen übertragbare humorale Immunität geht auf die B-Lymphozyten zurück. Sie bilden die zirkulierenden Antikörper und sind in komplexer Weise abhängig von T-Lymphozyten ("helper cells", "suppressor cells") und Makrophagen (19).

Vorläufer für beide Zellen ist eine lymphoide Stammzelle aus dem Knochenmark, im fetalen Leben auch aus Leber und Milz, wahrscheinlich auch aus Thymus und Lymphknoten stammend (20).

Im Thymus erhält ein Teil dieser Stammzellen durch bisher nicht definierte organspezifische Kontakteinflüsse und hormonähnliche Substanzen ("Thymosin") (7, 31) seine Prägung und entwickelt sich zu T-Lymphozyten. Ein anderer Teil wird, ebenfalls milieu- und wirkstoffbedingt ("Bursin") (31) durch ein weiteres primäres lymphatisches Organ (bei Vögeln die Bursa fabricii, bei den Säugern das hypothetische Bursaäquivalent) geprägt und so zu B-Lymphozyten (53). So leitet sich die Klassifizierung "T" von Thymus und "B" von Bursaäquivalent her.

T-Lymphozyten zeigen die Eigenart, mit Schaferythrozyten von nicht immunisierten Tieren (SRBC = sheep red blood cells) Rosetten zu bilden, das heißt, diese spontan rundum anzulagern (76). Dieses wenig aufwendige Rosettenverfahren läßt sich modifiziert auch bei dem Teil der B-Lymphozyten anwenden, der Fc-Rezeptoren oder solche für aktivierte Komplementkomponenten hat. Mit spezifischen Antikörpern (gegen SRBC) und SRBC stellt man einen Erythrozyten-Ambozeptor-Komplex (EA) für die ersteren und für die letzteren durch Zugabe von Komplement einen Erythrozyten-Ambozeptor-Komplement-Komplex (EAC) her (57). Die so vorbehandelten SRBC lagern sich dann den entsprechenden B-Lymphozyten an und es entstehen EA- bzw. EAC-Rosetten.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Bindungsvermögen der T-Lymphozyten für SRBC zu sogenannten E-Rosetten (Erythrozyten-Rosette; auch Spontan-Rosette) und das der B-Lymphozyten für EAC zu sogenannten EAC-Rosetten zur Unterscheidung und Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen benutzt. (Abb.: 1 S.: 3)

Die T-Lymphozyten wurden mit zwei Verfahren identifiziert. Die allgemein gebräuchliche "passive" Methode soll die gesamte T-Zell-Population erfassen, während der "aktive" Test nur eine Teilgruppe der T-Lymphozyten mit SRBC belädt. WYBRAN et al führte die Begriffe "aktiv" und "passiv" erstmals ein und nahm an, unter limitierenden Bedingungen die Gruppe der "aktiven", eigentlich immunkompetenten T-Lymphozyten aussondern zu können (76). (Siehe auch S.: 15 u. S.: 21). Gebräuchliche Bezeichnungen sind E - RFC ("Erythrocyte-rosette-forming-cells") und EAC-RFC ("EAC-rosette-forming-cells"), die auch von uns verwandt wurden.

Die Möglichkeit, Einblick in die Verteilung immunkompetenter Lymphozytengruppen nehmen zu können, führte zu der Frage nach etwaigen, mengenmäßig absoluten oder relativen Veränderungen im Zusammenhang mit Krankheitsgeschehen.

Als leichtest zugängliche Quelle für Lymphozyten sollte dabei Venenblut dienen. Stünde ein von der Norm signifikantes Abweichen (prozentual oder absolut) einer Lymphozytenpopulation vom normalen Niveau in Relation zu einer Krankheit, so könnte die Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen bedeutsam für die Pathogeneseforschung, Diagnostik, Therapie und Prognose sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch gemacht, eine solche Relation bei Kindern mit bakteriellen und viralen Infektionen festzustellen, um zu zeigen, inwieweit die Quantifizierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut klinisch bedeutsam und verwendbar ist. Zusätzlich wurden Kinder mit nicht infektiösen Erkrankungen als "positive Kontrollen" untersucht.

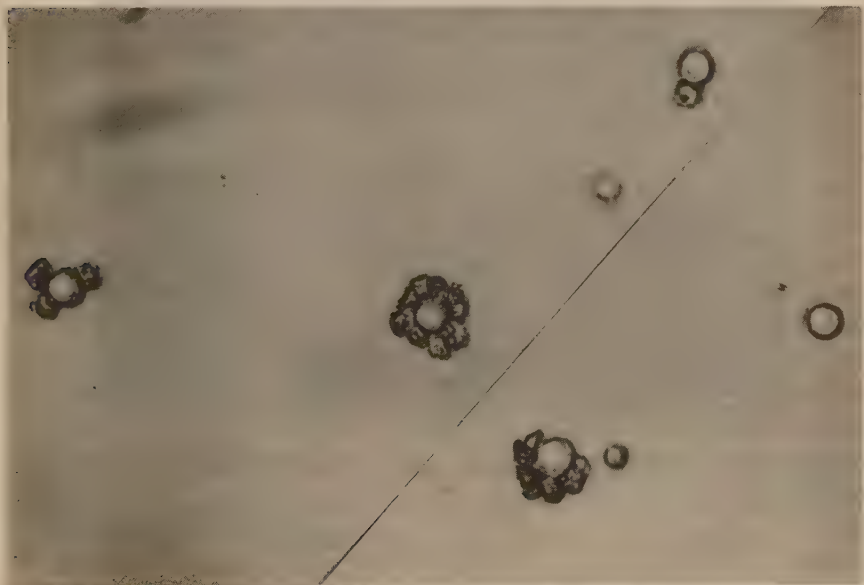


Abbildung 1: Eigene Aufnahme. 4 Lymphozyten mit anhängenden SRBC. In der Mitte eine Rosette im eigentlichen Sinn, rechts ein Lymphozyt ohne SRBC.

II. T- und B-Lymphozyten

1. Ontogenese der T- und B-Lymphozyten und ihre Aufgabe bei der Immunantwort:

Die Kenntnis von der Existenz zweier Lymphozytenpopulationen führte zur Suche nach verschiedenen Methoden zur Identifizierung, Isolierung und Erforschung ihrer möglichen Funktion.

Eine morphologische Unterscheidung von T- und B-Lymphozyten war auch elektronen-mikroskopisch nur teilweise möglich und gelang erst vor kurzem durch Verfeinerung der Methode mit dem Rasterelektronenmikroskop (45). (Abb.: 2 S.: 5)

Zuvor suchte man nach anderen Unterscheidungsmöglichkeiten und fand diese unter anderem auch in unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit (74), im Vorhandensein oder Fehlen spezifischer serologisch nachweisbarer Oberflächenantigene (10) und unterschiedlicher in vitro Reaktivität auf verschiedene Mitogene.

Heute werden T- und B-Lymphozyten verstanden als ausgeprägte Zelltypen an den entgegengesetzten Enden eines weiten Spektrums verschiedenster Lymphozytenuntergruppen (19). Es deutet vieles darauf hin, daß Lymphozyten während ihrer Entwicklung von der multipotenten Stammzelle zur reifen Zelle unterschiedliche Funktionen erfüllen, die dem jeweiligen Reifestadium zuzuordnen sind. Inwieweit nun einzelne Reifegrade für bestimmte Lymphozyten Endstadium bleiben oder eine Fortentwicklung stattfindet, scheint von den Anforderungen an das Immunsystem abzuhängen (5, 15, 52).

Unklar ist auch noch, ob die Lymphozytendifferenzierung in nur eine Richtung erfolgt oder nicht auch eine Rückdifferenzierung in schon durchlaufene Stadien möglich ist (20, 52).

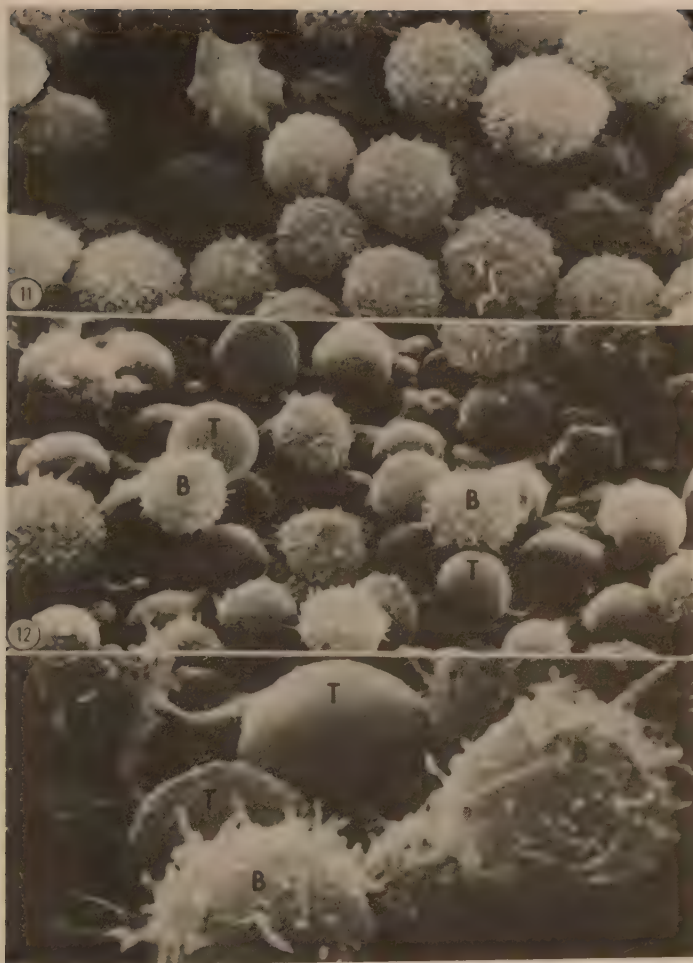


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme von POLLIACK et al (45) zeigt B-Lymphozyten mit mikrovilliartigen Ausstülpungen und T-Lymphozyten mit vergleichsweise glatter Oberfläche.

Schließlich unterscheiden sich die Lymphozytenpopulationen in Art und Zusammensetzung je nach der Herkunft des Untersuchungsmaterials. Als Quellen für Lymphozyten dienten Thymus, Lymphknoten, Milz, Appendix, Tonsillen, Ductus thoracicus, Knochenmark, Venenblut und entzündlich infiltrierte oder maligne entartete Gewebeproben (5, 52, 62, 67, 82).

ZEILLER (84) untersuchte einzelne Subpopulationen thymusabhängiger Lymphozyten bei der Maus und findet fünf verschiedene Entwicklungsstadien, worauf er folgende Sequenzhypothese gründet:

T_1 seien in großer Zahl im Cortex des Thymus befindliche Thymozyten kleineren Zellvolumens mit geringer negativer Membranladung, hohem Gehalt an Θ -Antigen*, hoher Cortisonempfindlichkeit, ohne Immunkompetenz und Transplantatreaktivität. In der folgenden Entwicklung über T_2 - und T_3 -Thymozyten hin zu T_4 - und T_5 -Lymphozyten wandern die Zellen ins Thymusmark (T_2 , T_3) und schließlich in die Peripherie (T_4 , T_5). Ihre Membran erhält in demselben Maße eine immer höhere negative Ladung, wie der Gehalt an Θ -Antigen abnimmt. Ab T_3 besteht keine Cortisonempfindlichkeit mehr, die Transplantatreaktivität tritt zunehmend auf, T_4 und mehr noch T_5 sind die eigentlich immunkompetenten Zellen. Beide Möglichkeiten, T_4 als Vorläufer von T_5 oder T_4 und T_5 als eigenständige Endstadien werden in Betracht gezogen.

Von zwei "post-thymic" Zellpopulationen in peripheren lymphatischen Organen beim Menschen schreibt auch RITZMANN (53). Die Areale der sekundären lymphatischen Organe, in die thymusabhängige Lymphozyten nach ihrer Reifung wandern, sind die parakortikalen Regionen in den Lymphknoten bzw. die periarteriolen Scheiden in der Milz (29).

*Ein für die Maus spezifisches Antigen auf der T-Lymphozytenmembran, möglicherweise vergleichbar mit dem HTLA (human thymic lymphocyte antigen) beim Menschen (62).

RITZMANN bezeichnet die stationär in den T-Lymphozytenarealen bleibende Gruppe mit T_1 , die daraus gereifte, zahlenmäßig größere mobilisierbare und rezirkulierende Gruppe mit T_2 .

Bei Antigenkontakt reagiert dieser T_2 -Lymphozyt zunächst in einer Weise, die blastoide Transformation genannt wird und mit mannigfaltigen Strukturveränderungen und Zellvermehrung einhergeht (25). Diese kann auch in vitro mit verschiedensten Mitogenen und Antigenen induziert werden (PHA = Phytohemagglutinin; Concavalin A; Streptolysin O u.a.).

Das Ergebnis der Transformation, die auch von Makrophagen in noch ungeklärter Weise ("antigen-processing" zum "Super-Antigen") (55) mit ausgelöst wird, ist der sensibilisierte T-Lymphozyt. Dieser bewirkt nun in entscheidender Weise die zelluläre Immunantwort. Nach RITZMANN differenziert er in wenige, kurzlebende T_3 -Zellen (Killer- oder Effektorzellen*) und zum größten Teil in langlebende T_4 -Zellen. Die langlebenden T_4 -Zellen erfüllen die Aufgabe des immunologischen Gedächtnisses als sogenannte "memory"-Zellen und sollen beim Menschen eine Halbwertszeit bis zu 30 Jahren haben (19). Die T_3 -Zelle zerstört einerseits die Zielzelle durch Zytotoxine, bewirkt andererseits durch Sekretion humoraler Wirkstoffe (Lymphokine) die Aktivierung anderer an der Immunantwort beteiligter Zellen und Vorgänge.

* Die Bezeichnung "Killer"-(K)-Zellen wird auch für solche Zellen verwandt, -die bei der antikörpervermittelten Zytotoxizität Effektoren sind und weder T-Zellen noch reife B-Zellen zu sein scheinen (44, 51).

Die wichtigsten dieser T-Lymphozytenprodukte bewirken die Konzentration und Aktivierung von Makrophagen*, Gefäßveränderungen und vermehrte Lymphozytenaktivierung (32, 51). Die T_4 - "memory"-Zelle rezirkuliert weiter im Organismus und ist in der Lage, sich nach erneutem Kontakt mit demselben Antigen sofort in eine T_3 -Zelle zu transformieren und so die sekundäre Immunantwort zu beschleunigen und zu potenzieren (siehe Abb.: 3 S.: 11)

Mag auch die genaue Rolle der T-Lymphozyten bei der Immunantwort noch hypothetisch sein, so kann doch ihre Thymozytenherkunft und ihre Helfer-, Effektor-, aber auch Suppressorfunktion auf andere Zellen (Makrophagen-Monozyten; T- und B-Lymphozyten) im Rahmen der Immunantwort als gesichert gelten (5, 17, 20, 27, 52, 67, 80).

Ihr hoher Anteil von 70 - 80 % der Gesamtl lymphozyten in Blut und Lymphe, mit einer Rezirkulationszeit von etwa 4 Stunden beim Menschen, kennzeichnet ihre Aufgabe: Jeder Winkel des Organismus wird wieder und wieder von ihnen nach Antigen abgesucht, um bei Kontakt mit diesem die Immunantwort in Gang zu bringen (19).

Der Weg der B-Lymphozyten, ebenfalls ausgehend von der multipotenten Stammzelle, führt zunächst in das "Bursaäquivalent", welches beim Säuger z.B. in den Tonsillen, dem Appendix und den Peyerschen Plaques oder auch direkt im Knochenmark vermutet wird (29, 52, 19).

Nach dem Reifungsprozeß siedeln sie sich in den B-Lymphozytenarealen der sekundären lymphatischen Organe, den Keimzentren und Primärfollikeln der Lymphknoten sowie den Keimzentren und den interfollikulären Zonen der Milz an (29).

* (z.B. MIF = Migrations inhibierender Faktor für Makrophagen die an den Ort des zellulären Immungeschehens durch einen MAF = Makrophagen aktivierender Faktor gelockt wurden) (32).

Dort bleiben die meisten B-Lymphozyten stationär und nur ein geringer Teil, der in Blut und Lymphe 20 - 30 % der Gesamtlymphozyten ausmacht, rezirkuliert. Auch sie antworten auf Antigenkontakt mit Sensibilisierung und blastoider Transformation (20), die mit der Produktion von spezifischen Antikörpern einhergeht und die humorale Immunantwort darstellt.

Es gibt allerdings nur wenige Antigene, bei denen zur Auslösung einer Immunantwort die Stimulation von B-Zellen allein ausreicht. Hierbei handelt es sich immer um großmolekulare Strukturen, auf denen dieselbe Determinante häufig wiederkehrt (z.B. Pneumokokkenpolysaccharide) (38, 55).

Sowohl die Sensibilisierung als auch die Auslösung der Transformation bedarf in der Regel der Anwesenheit löslicher Faktoren von - und/oder Beeinflussung durch - andere Zellen. Zu diesen zählen in erster Linie T-Lymphozyten, aber auch polymorphkernige Granulozyten und Monozyten-Makrophagen (14, 20, 21, 27).

Die Plasmazelle ist eine antikörperproduzierende Zelle und Endzelle der B-Lymphozytentransformation (29, 38, 55), ob schon auch die Zugehörigkeit zu einer eigenen Zellentwicklungsreihe diskutiert wird (20).

Die Entwicklung zu einer immunologischen "Gedächtnis"-Zelle findet auch in der B-Reihe statt. Ob diese Zellen aber direkt aus der blastoiden Transformation hervorgehen oder Endstadien der antikörperproduzierenden Zellen nach Abschluß der Antikörper-Sekretion sind, ist nicht restlos geklärt (20, 38, 52).

Die Kooperation von T- und B-"memory"-Zellen bei der Immunantwort auf Antigene, die aus Hapten- und Trägerantigen bestehen, ist gekennzeichnet durch unterschiedliche Spezifität. Eine B-Zelle, spezifisch für das Hapten, wird erst nach einer "Helferinformation" (in Form löslicher Mediatoren) von der für den Hapten-Träger spezifisch sensiblen T-Zelle zur Antikörperproduktion befähigt (27, 38).

Abbildung 3: Immunantwortmechanismen (modifiziert nach BERG und ROWLANDS)

Phase I : Antigen-"processing" und -transport durch Makrophagen

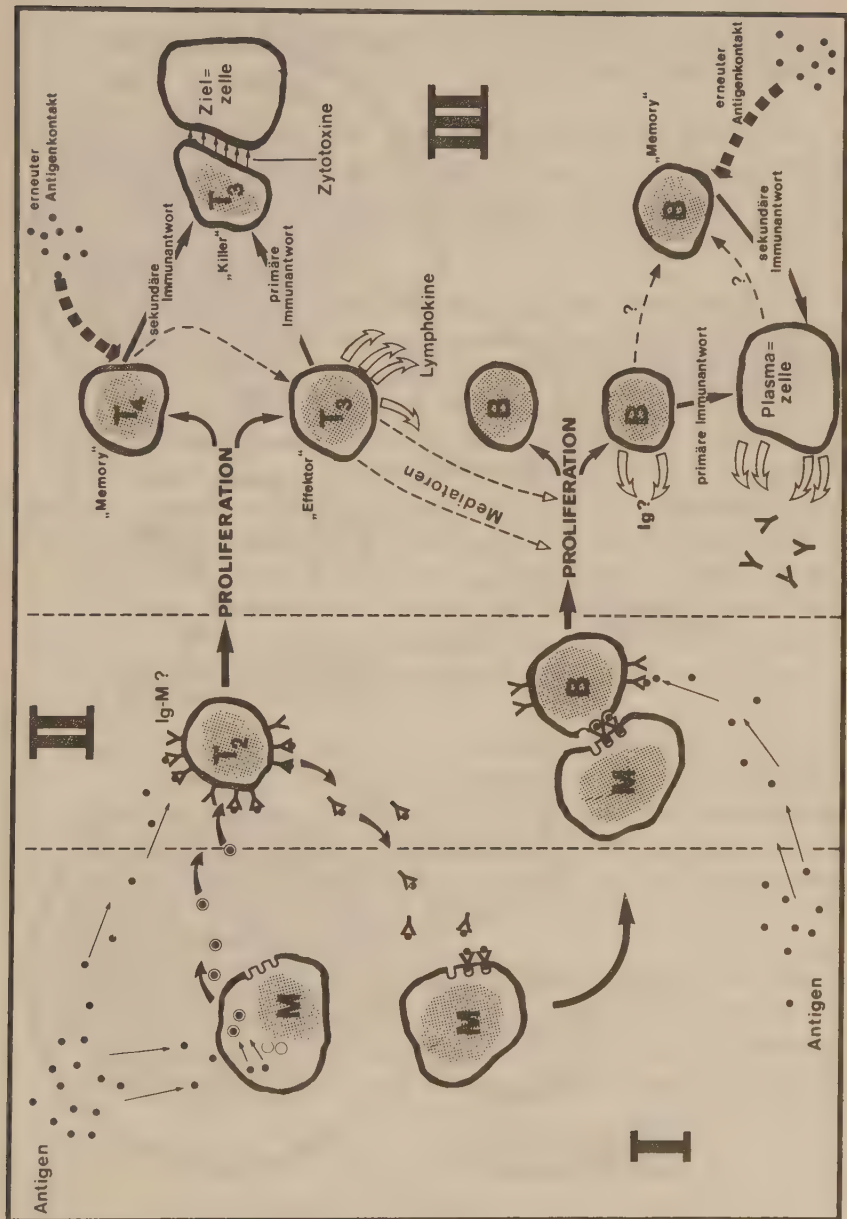
Phase II : Sensibilisierung von T- und B-Lymphozyten

Phase III: Proliferation der antigenspezifisch gewordenen Lymphozyten und primäre sowie sekundäre Immunantwort.

● = Antigen

◎ = "processed Antigen"

Y = Immunglobulin



2. Membraneigenschaften von Lymphozytenpopulationen und Rezeptortheorien.

Die Suche nach Membranmerkmalen der Lymphozyten, die zur Identifizierung und dem Verständnis ihrer Funktion dienen können, brachte die klarsten Ergebnisse für die Membran der B-Lymphozyten:

Auf der Oberfläche nahezu aller B-Lymphozyten findet sich von der Zelle synthetisiertes Immunglobulin. Es kann z.B. durch radioaktiv- oder fluoresceinmarkierte heterologe Antiseren dargestellt werden und dient so zur Identifizierung (11, 16, 31, 55, 82). Ob immer nur eine oder mehrere Ig-Klassen auf der Membran eines B-Lymphozyten vorhanden sind, bedarf noch letzter Klärung. Ein mit der Reifung des B-Lymphozyten einhergehender Wechsel des jeweils sezernierten Ig, von Ig-M zu Ig-G und Ig-A ist wahrscheinlich und wird möglicherweise durch sensibilisierte T-Lymphozyten kontrolliert (29, 57). Jedenfalls läßt sich jeder Ig-Klasse (Ig-M; -G; -A; -D; -E;) ein bestimmter Anteil von Träger-B-Lymphozyten zuordnen.

Ein zweites Oberflächenmerkmal auf einem großen Teil der B-Lymphozyten ist ein Rezeptor für bestimmte, aktivierte Komplementkomponenten (C_3b ; C_3d ; C_4), vergleichbar mit dem auch auf der Makrophagenmembran befindlichen Komplement-C'-Rezeptor (15, 31, 35, 42, 55). Dieses wird beim EAC-Rosettentest zur Identifizierung benutzt.

Ein weiteres Merkmal sind Rezeptoren für das Fc-Fragment von aggregiertem Ig-G auf der B-Zellenmembran. Sie stehen nicht in Zusammenhang mit den Ig-Molekülen der Lymphozytenoberfläche und dienen beim EA-Rosettentest zur Identifizierung (19, 31, 35, 55).

(Siehe Abb. 4, folgende Seite)

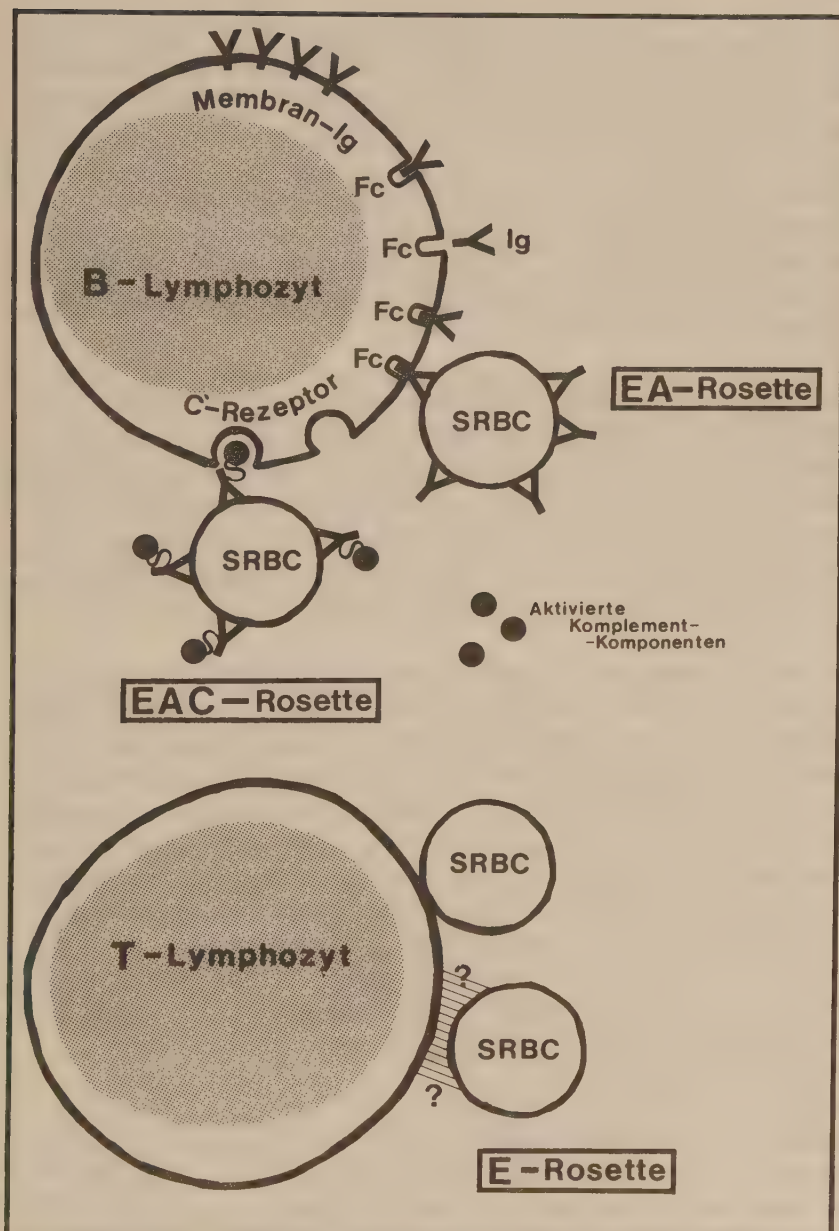


Abbildung 4: Membranmerkmale von Lymphozyten und Erklärung des Rosettenphänomens. Erklärung siehe Text.

Schließlich sind auf der B-Lymphozytenmembran noch Rezeptoren für das Epstein-Barr (EB)-Virus und für Mauserythrozyten nachgewiesen worden, auf die hier nicht näher einzugehen ist (31).

Auch auf T-Lymphozyten soll ein Fc-Rezeptor existieren, jedoch nicht permanent, sondern nur in einer gewissen Phase der Aktivierung (19, 44, 55, 57). Dieser Rezeptor ist auch bei den K-Zellen nachweisbar, den Effektoren der antikörpervermittelten Zytotoxizität (44, 51).

Ein weiteres T-Lymphozyten-Membranmerkmal ist das HTLA (human thymic lymphocyte antigen), welches während der Thymuspassage erworben wird und mit Anti-T-Zellserum nachweisbar ist (19, 43, 55, 62). Auch die elektronegative Membranladung, Ausdruck einer bei T-Lymphozyten erhöhten Anzahl von Sialinsäuremolekülen auf der elektrokinetischen Fläche kann zur Abtrennung von T-Zellen benutzt werden (41, 84).

Die größte Ungewißheit besteht über die biochemische und biologische Eigenart des Rezeptors, der auch in dieser Arbeit zur Identifizierung von T-Lymphozyten benutzt wurde, des Rezeptors für unbehandelte SRBC. Die Spezifität und experimentelle Anwendbarkeit zum T-Lymphozyten-Nachweis gilt jedoch als erwiesen (5, 43, 55, 58, 80, 83). Zwar formen auch einige Monozyten E-Rosetten, was aber bei Untersuchungen von T-Lymphozyten kaum Einfluß auf die Ergebnisse hat (49). Wegen der hohen Ausbeute an markierbaren Zellen wird eine Antigenspezifität des Rezeptors ausgeschlossen (5, 58). Die große Neigung der Rosetten, durch mechanische Einflüsse wieder zu zerfallen (33), läßt den Schluß auf sehr schwache Bindung eines dünn auf der Membran verteilten oder durch andere Substanzen verdeckten Rezeptors zu (6, 12, 43, 83). Mehrere Reagentien wurden dem Rosettenansatz zugefügt oder zur Vorbehandlung von Lymphozyten oder SRBC benutzt, um dadurch unterschiedlich hohe RFC-Ausbeuten zu erhalten (16, 57, 78).

Dennoch ließen die Ergebnisse solcher Untersuchungen nur Hypothesen über die Art des E-Rezeptors betreffend zu. Offensichtlich handelt es sich um eine "Kreuzreaktion" mehrerer Membranfaktoren beider Zellen (26). Ob diese zufällig (6, 58) oder immunbiologisch induziert ist (4, 6), bedarf noch der Klärung. Bei Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten sich in der Kontaktzone zwischen T-Lymphozyt und SRBC mikrovilliartige Ausstülpungen der T-Zellmembran, was eine Erklärung für das Rosettenphänomen sein könnte (19).

Die Suche nach Immunglobulin auf der T-Zellmembran war bei vielen Untersuchungen erfolglos. Einige Untersucher fanden aber Membran-Ig, wenn auch nur bei einer zahlenmäßig kleinen T-Zell-Gruppe. Ebenso von der Zelle synthetisiert, scheint es mehr innerhalb der Membran punktförmig konzentriert und deshalb weniger leicht nachweisbar zu sein. Diskutiert wird ein Ig des monomeren Ig-M Typs, aber auch die Möglichkeit einer eigenen, noch unbekannten Ig-Klasse (4, 21, 54, 55, 66).

Der auch in unseren Untersuchungen berücksichtigte Unterschied zwischen "aktiven" und "passiven" E-RFC wurde von TAK YAN YU genauer untersucht (83). Er verglich die Fähigkeit der zuvor getrennten Subpopulationen, unter verschiedenen Bedingungen "caps" zu bilden. Das auch von anderen Autoren beschriebene Phänomen ist die energieabhängige, aktive Verschiebung von Rezeptoren auf der Lymphozytenmembran (4, 16, 54). Diese Rezeptorenverschiebung, bei den B-Lymphozyten auch Umverteilung von Membran-Ig, erfolgt nach einem Pol hin. Aus dem ursprünglich ringförmigen Zustand entstehen so nach Sensibilisierung pferdehuf- und kappenähnliche Bilder, bis hin zu einer pseudopodienartigen Zellausstülpung. TAK YAN YU fand Unterschiede bezüglich der Rezeptorenverteilung auf der Membran und ihres Gehaltes von Sulfhydrylgruppen und Sialinsäuremolekülen zwischen "aktiven" und "passiven" T-Lymphozyten.

Nach WYBRAN sind die "aktiven" T-Lymphozyten diejenigen mit der höheren Affinität zu SRBC. Sie repräsentieren die für die zelluläre Immunität kompetente T-Zell-Untergruppe, der auch eine entscheidende Rolle bei der Vernichtung von Tumorzellen zukommt. Vieles weist darauf hin, daß die "aktiven" T-Lymphozyten den MIF (Migrations-inhibierender-Faktor) für Makrophagen sezernieren und diejenigen T-Lymphozyten sind, die mit PHA zur Transformation zu stimulieren sind (17, 47, 73, 78, 80).

Anzufügen ist noch, daß auf der Membran ein und desselben Lymphozyten T- und B-spezifische Merkmale existieren können. CHIAO findet 2,06 % solcher Lymphozyten mit beiden Merkmalen bei Gesunden (Mittelwert) und nennt sie "D-Zellen" ("double"-Zellen) (15). DEWAR ermittelte bei einem Patienten mit prolymphozytischer Leukämie 10 % solcher D-Zellen (18).

Auch Zellen ohne T- oder B-Membranmerkmale, die aber morphologisch unzweifelhaft Lymphozyten sind, finden sich im peripheren Blut. Von diesen sogenannten "Null-Zellen" sollen etwa 5 % im Blut Gesunder zirkulieren (5). Höher ist deren Prozentsatz bei Patienten mit primärem oder sekundärem Immundefekt (39).

Beide Zellarten könnten Übergangsformen, mangelnd ausgereifte Zellen oder Angehörige einer eigenen Entwicklungsreihe sein (35).

Einen Überblick über Oberflächenmerkmale und Nachweismethoden verschiedener Lymphozytengruppen soll folgende Tabelle geben:

Merkmal	B-Zelle	T-Zelle	K-Zelle	D-Zelle	Nachweis
Immunglobuline	+	-	-	+	Immunfluoreszenztest etc.
Fc-Rezeptor für aggregiertes Ig	+	-	+	+	EA-Rosettentest anti-Ig-Serum
Komplement-Rezeptoren	+	-	+	+	EAC-Rosettentest
B-Lymphozyten-antigen (HBLA)	+	-	?	?	anti-B-Serum
SRBC-Rezeptor	-	+	-	+	E-Rosettentest
T-Lymphozyten-antigen (HTLA)	-	+	?	?	anti-T-Serum
Rezeptor für EB-Virus	+	-	?	?	EBV-Rosettentest
Mauserythrozyten-Rezeptor	+	-	-	-	M-Rosettentest

Tabelle 1:

Oberflächenmerkmale und mögliche Nachweismethoden menschlicher Lymphozyten.

III. Material und Methode:

Die im Folgenden beschriebenen und für diese Arbeit verwendeten Methoden zur quantitativen Bestimmung von T- und B-Lymphozyten im Venenblut sind angelehnt an die bei WYBRAN et al (76) und im WHO-Report (49) beschrieben.

1. Verwendete Reagenzien:

- Heparin 5000 USP-E/ml; ohne Konservierungsmittel als Antikoagulans.
- FBS ^R "phosphate buffered saline" ohne Mg und Ca, eingestellt auf einen pH von 7,2 bzw. 7,3 (DULBECCO) und
- RFMI 16-C ^R ohne Glutamin (FLOW), zum Waschen der Lymphozyten und als Inkubationsmedium.
- Veronalpuffer Veronalgepufferte Kochsalzlösung 0,15 M pH 7,4.
- Ficoll-Hypaque selbst hergestellt, spezifisches Gewicht 1,077 g/ml, zur Lymphozytenabtrennung.
- IPT-FCS ^R immunopräzipitin getestetes, gammaglobulinfreies fetales Kälberserum (GIBCO) als Inkubationszusatz.
- SRBC Hammelerythrozyten in Alsevers Lösung für den E-Rosettentest.
- EAC Antikörper-Komplement beladene Hammelerythrozyten (Antisheephämolysin vom Kaninchen, GIBCO; Mausserum) für den EAC-Rosettentest.
Die Hammelerythrozyten waren maximal 7 Tage alt und stammten immer von demselben Tier.
- Falcon-Plastics ^R 5 cm steril für Zentrifugationen und Inkubationen.

2. Durchführung des Testes:

Siehe hierzu auch Abbildung 7 auf Seite 35

- a) Zur Blutgewinnung wurden 5 - 7 cm Venenblut in eine heparinbenetzte, sterile Plastikspritze aufgezogen und dies in sterilisierten Sterozyllindern mit dem doppelten Volumen PBS (pH 7,2) gemischt. Der Rosettentest erfolgte spätestens 3 Stunden nach der Blutabnahme.

- b) Zur Lymphozytenabtrennung wurden Falcon-Plastic[®] halb mit dem Blut-PBS-Gemisch gefüllt und dann mit derselben Menge Ficoll-Hypaque unterschichtet. Mit ca. 400 g an der Trennfläche wurden die Röhrchen 40 min. lang zentrifugiert.

Danach wurde der auf dem Ficoll-Hypaque aufliegende Lymphozytenring mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in zwei Röhrchen gesammelt und in diesen gewaschen:

- einmal 10 min. bei 500 g
- zwei weitere Male 10 min. bei 350 g.

Nach jedem Waschen wurde der Überstand des Mediums (PBS pH 7,3 für die SRBC; RPMI 1640 für die EAC) abgesaugt und verworfen. Zum letzten Waschgang wurden die Lymphozytensuspensionen in ein Röhrchen gesammelt und der Überstand nach dem Waschen bis auf 0,25 ml abgesaugt.

- c) Einstellen der Lymphozytensuspensionen auf eine konstante Zahl von Lymphozyten pro Volumen:

- Für den E-Rosettentest wurde eine konstante Zahl von Lymphozyten pro Tropfen Suspension eingestellt. Dies brachte für das weitere Vorgehen Erleichterung und sicherte dennoch eine ausreichende Genauigkeit. Zunächst wurde die Zahl der in den 0,25 ml enthaltenen Lymphozyten bestimmt und abgezählt, wieviel Tropfen Suspension aus der verwendeten Pasteurpipette 0,25 ml ergeben. Dann wurde

die Suspension mit PBS (pH 7,3) so verdünnt, daß ein Tropfen der verdünnten Suspension 500 000 Lymphozyten enthielt.

- Für den EAC-Rosettentest wurde eine Suspension in einer Konzentration von 2×10^6 Lymphozyten pro ml hergestellt.
- d) Zum Herstellen der SRBC-Suspension für den E-Rosettentest wurden 15 Tropfen des Hammelerythrozytenkonzentrates dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; (jeweils eine Minute bei 1200 g zentrifugiert). Danach wurde der Überstand von dem Erythrozytensediment vollständig abgesaugt und von diesem 3 Tropfen mit 25 ml physiologischer Kochsalzlösung vermischt. So erhielt man eine absolute Erythrozytenzahl von $1,3 - 1,5 \times 10^6$ pro Tropfen dieser Suspension und es wurde im Ansatz ein Verhältnis von Erythrozyt : Lymphozyt wie 8 : 1 erreicht.
- e) Vor dem Herstellen der EAC-Suspension wurden die SRBC ebenfalls dreimal gewaschen. Dann wurde eine 5 %ige SRBC/RPMI 1640 - Suspension zu gleichen Teilen mit einer Antikörperverdünnung (Antisheephämolyisin 1 : 100 in PBS) gemischt und 15 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert (EA). Die so erhaltene EA-Suspension wurde 10 min. bei 700 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit Veronalpuffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Das aus Mäuseblut gewonnene Serum (= Komplement) wurde 1 : 10 mit Veronalpuffer verdünnt und 1 Teil dieser Verdünnung mit 1 Teil der EA-Suspension 45 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 2 x in Veronalpuffer und 1 x in RPMI 1640 gewaschen und danach auf das ursprüngliche Volumen mit RPMI 1640 aufgefüllt.

Die beiden Erythrozytensuspensionen nach d) und e) sind eine Woche im Kühlschrank haltbar, sollen jedoch vor jedem Gebrauch einmal gewaschen werden.

f) Ansatz und Inkubation der Lymphozyten/SRBC - Suspensionen:

Für den "aktiven" E-Rosettentest wurden zwei Röhrchen mit je einem Tropfen Lymphozytensuspension und einem Tropfen IPT-FCS, das eine bei Zimmertemperatur, das andere bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden 3 Tropfen der SRBC-Suspension hinzugefügt, 5 min. bei 200 g zentrifugiert und anschließend sofort ausgezählt.

Für den "passiven" E-Rosettentest wurden zwei Röhrchen mit je einem Tropfen Lymphozytensuspension, einem Tropfen IPT-FCS und drei Tropfen SRBC-Suspension sogleich bei 200 g 5 min. zentrifugiert. Danach wurde eines bei 37°C , das andere bei Zimmertemperatur eine Stunde inkubiert und dann ausgezählt.

Für den EAC-Rosettentest wurden 0,3 ml Lymphozytensuspension und 0,3 ml einer 0,5 %igen EAC-Suspension in einem Röhrchen gemischt und 30 min. bei 37°C im Brutschrank auf einem Schüttler inkubiert.

- g) Die Auszählung der Rosetten erfolgte mit dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung in einer Neubauer-Zählkammer. Das Sediment des E-Rosettentestes wurde vor Einbringen in die Zählkammer durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens resuspendiert.

Gezählt wurden pro Test 100 Lymphozyten (mononukleäre Zellen), wobei jeder Lymphozyt mit drei und mehr angelaagerten Lymphozyten als Rosette zählte. Bei auffallend abweichenden Prozentsätzen von RFC's (rosette forming cells) wurden 200 Zellen gezählt, ohne daß dabei signifikant abweichende Ergebnisse festzustellen waren.

Neben der prozentualen Verteilung wurde auch die absolute Zahl der Lymphozytenpopulationen pro mm^3 mit Hilfe des Differentialblutbildes rechnerisch ermittelt.

3. Patientengut:

Ziel der Studie war es, Kinder aller Altersgruppen, vornehmlich solche mit Infektionen unterschiedlicher Genese zu untersuchen. Im Verlauf der Untersuchungen traten folgende Schwierigkeiten auf: Einmal sollte, mit Rücksicht auf die Kinder, eine Blutabnahme nur dann erfolgen, wenn sie im Rahmen der Behandlung ohnehin angezeigt war. Selbst dann ergaben sich bei Säuglingen Bedenken wegen der für die Untersuchung benötigten Blutmenge. Zum zweiten stellte sich häufig nach durchgeführtem Test bei weiterer Beobachtung des Patienten heraus, daß dieser nicht in die zunächst angenommene Patientengruppe einzuordnen war.

Dies erklärt das Überwiegen der Gruppe von Probanden mit bakteriellen Infektionen, die kleinere Gruppe mit viralen Infektionen und die verschiedenen anderen, zum Teil nicht einzuordnenden Fälle.

Die Probanden für die insgesamt 90 an der Universitäts-Kinderklinik München durchgeführten Tests setzen sich aus folgenden Gruppen zusammen:

a) Kontrollgruppe:

19 gesunde Kontrollpersonen, davon 7 Kinder zwischen 2 1/2 und 13 Jahren und 12 Erwachsene zwischen 18 und 30 Jahre alt. Bei einer Doppeluntersuchung ergibt sich eine Fallzahl von 20.

b) Kinder mit bakteriellen Infektionen: (siehe Tabelle Iu.II)

Insgesamt 30 Kinder zwischen 1 Monat und 16 Jahre alt:

- 8 Infektionen der oberen Luftwege und/oder Pneumonien
- 8 Harnwegsinfektionen
- 3 Hautinfektionen

- 2 Tonsillitiden
- 2 Sepsisfälle
- 2 Meningitisfälle
- 2 Osteomyelitisfälle
- 3 Infektionen unterschiedlicher Art

2 Kinder wurden zweimal untersucht, womit sich eine Fallzahl von 32 ergibt.

c) Kinder mit Virusinfektionen: (siehe Tabelle III)

3 Kinder im Alter zwischen 5 und 14 Jahren und 2 Erwachsene, 18 und 25 Jahre alt, wurden untersucht. Zur Sicherung der Diagnose wurde außer dem typischen Krankheitsbild das Differentialblutbild und der wiederholt negative bakterielle Befund herangezogen. Fallzahl 15.

d) Abzugrenzen von den Infektionspatienten sind die Probanden, bei denen immunologische Erkrankungen unterschiedlicher Art mit zum Teil erhöhter, krankheitsbedingter Infektionsanfälligkeit vorlagen:

- | | |
|-------------------------------------|----------------------|
| - mit Tumoren | 4 (siehe Tabelle IV) |
| - mit akuter lymphatischer Leukämie | 2 |
| - mit primären Immundefizienzen | 7 (siehe Tabelle V) |
| - mit Autoimmunerkrankungen | 5 (siehe Tabelle VI) |
| - Verschiedene | 4 |

Ein Kind wurde zweimal untersucht, womit sich eine Fallzahl von 23 ergibt.

4. Versuchsbedingungen:

Von nahezu allen Probanden wurde im Haematologischen Labor der Klinik ein Differentialblutbild angefertigt. Der Test wurde in allen Fällen unter konstanten Bedingungen nur von einem Untersucher durchgeführt, wobei die Objektivität der

Auszählungsergebnisse in regelmäßigen Abständen von einem in diesem Test Erfahrenen überprüft wurde.

Um eine subjektive Beurteilung der Ergebnisse einzuschränken, wurden für die Kennzeichnung von Röhrchen, Zählkammerhälften und Auswertungsprotokoll Punktesymbole mit Datum verwandt und nicht die Namen der Probanden. In den meisten Fällen war bei Durchführung des Testes die endgültige Diagnose des untersuchten Patienten noch nicht bekannt.

IV. Ergebnisse eigener Untersuchungen:

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die E - RFC mit vier verschiedenen Tests ermittelt (siehe S.21). In Übereinstimmung mit anderen Autoren erwies sich die einstündige Inkubation bei 37°C zumindest für den "passiven"-Test als unbrauchbar:

Inkubiert bei	Kontrollen (8)		Infektionspatienten (8)	
	a	p	a	p
Zimmertemperatur	38,5 $\pm$ 8,0	42,2 $\pm$ 6,2	39,6 $\pm$ 6,3	42,2 $\pm$ 8,7
37° C	36,2 $\pm$ 6,1	17,5 $\pm$ 8,1	34,3 $\pm$ 9,8	20,2 $\pm$ 7,3

Tabelle 2:

Vergleich der Mittelwerte von E-RFC bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. (Mittelwerte in % $\pm$ Standardabweichung; a = aktive RFC; p = passive RFC; in Klammern die Zahl der Untersuchungen)

Da diese Ergebnisse bei beiden Gruppen geringere Werte ergaben und bei den "passiven"-RFC weit unter dem erwarteten Prozentsatz (etwa 50 %) lagen, wurden bei den folgenden Untersuchungen die Suspensionen lediglich bei Zimmertemperatur inkubiert.

1. Kontrollgruppe:

Gesundes Klinikpersonal und Kinder, die zur Beobachtung wegen verschiedener nicht infektiönsbedingter Erkrankungen stationär waren (z.B. Adipositas, zerebrale Anfallsleiden, endokrinologische Erkrankungen, Frakturen), stellten die Kontrollgruppe. Da Alter und Geschlecht kaum Einfluß auf die prozentuale Verteilung von T- und B-Lymphozyten bei Gesunden haben, ist diese Zusammensetzung der Kontrollgruppe zulässig (22, 47, 78).

	% E - RFC		% EAC-RFC	E - RFC / mm ³		EAC-RFC/mm ³
	a	p		a	p	
$\bar{x}$	34,8	44,5	16,8	955	1220	446
$\pm$ SA	$\pm 6,8$	$\pm 6,0$	$\pm 3,2$	± 269	± 371	± 168
n	20	20	8	17	17	7
Str.	17-48	36-55	14-24	635-1428	699-2040	280-734

Der Mittelwert der Lymphozytenzahl/mm³ war: 2675 $\pm$ 726

Tabelle 3:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kontrollpersonen in Prozent und absoluter RFC-Zahl pro mm³.

Symbole wie auch in den folgenden Tabellen:

$\bar{x}$ = Mittelwert; SA = Standardabweichung; n = Fallzahl; Str. = Streuung;
a = "aktive"; p = "passive".

2. Kinder mit bakteriellen Infektionen:

Bei der Auswahl dieser Patientengruppe wurde Wert darauf gelegt, möglichst nur rein bakterielle Infektionen zu berücksichtigen. Im Lauf der Untersuchungen wurde deshalb die Gruppe mit bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes abgetrennt, da bei dieser mit einer vorausgegangenen Virusinfektion gerechnet werden mußte (37).

	% E - RFC		% EAC-RFC	E - RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
	a	p		a	p	
$\bar{x}$	34,4	45,2	18,2	890	1196	457
+SA	+7,9	+7,5	+3,1	+378	+474	+204
n	22	23	12	19	19	10
Str.	20-49	31-57	12-23	237-1589	367-2085	136-782

Der Mittelwert der Lymphozytenzahl/mm³ war: 2664 ± 999

Tabelle 4 a:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit bakteriellen Infektionen in Prozent und absoluter RFC-Zahl pro mm³

	% E - RFC		% EAC-RFC	E - RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
	a	p		a	p	
$\bar{x}$	41,3	47,3		1136	1296	
+SA	+7,4	+5,1		+616	+707	
n	9	9	3 !	9	9	3 !
Str.	29-53	40-55	11/20/24	238-2146	346-2298	90/424/1021

Der Mittelwert der Lymphozytenzahl/mm³ war: 2665 ± 1292

Tabelle 4 b:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes in Prozent und absoluter RFC-Zahl pro mm³.

Ein Kind mit Meningitis (Fall 15 und 29) wurde zweimal untersucht:

	% E-RFC		Leukozyten	Lymphozyten		E-RFC/mm ³	
	a	p	/mm ³	%	/mm ³	a	p
3.9.74	41	41	8000	15	1200	492	492
27.9.74	44	47	8600	42	3612	1589	1697

Ein Kind mit Bronchitis und Sinusitis (Fall 25 und 31) wurde zweimal untersucht:

	% E-RFC		Leukozyten	Lymphozyten		E-RFC/mm ³	
	a	p	/mm ³	%	/mm ³	a	p
24.9.74	46	47	5400	32	1728	794	812
3.10.74	40	47	8850	24	2124	849	998

Trennt man die Gruppe a) nach Alter auf, so ergeben sich folgende Werte:

		2 - 6 Jahre			7 - 12 Jahre		
		$\bar{x}$	$\pm SA$	n	$\bar{x}$	$\pm SA$	n
% E - RFC	a	32,2	$\pm 10,1$	8	35,7	$\pm 6,4$	14
	p	44,0	$\pm 8,1$	8	45,8	$\pm 7,3$	15
% EAC-RFC		18,4	$\pm 1,8$	5	18,0	$\pm 4,0$	7
E - RFC/mm ³	a	901	± 392	7	883	± 388	12
	p	1292	± 506	7	1139	± 465	12
EAC - RFC/mm ³		527	± 179	5	387	± 221	5
Lymphozyten/mm ³		2742	± 743	7	2621	± 1153	12

Tabelle 5:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit bakteriellen Infektionen, aufgeteilt in zwei Altersgruppen in Prozent und absoluter RFC-Zahl pro mm³.

3. Kinder mit Virusinfektionen

Soweit es sich nicht um "klassische" Virusinfektionen (Mumps, Röteln, Herpes) handelte und ein Erregernachweis negativ verlief, wurde die Diagnose durch Bewertung des klinischen Verlaufs (Temperatur, Differentialblutbild, etc) gesichert.

	% E - RFC		% EAC-RFC	E - RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
	a	p		a	p	
$\bar{x}$	33,3	45,0	19,2	1213	1571	876
$\pm$ SA	$\pm 7,8$	$\pm 10,0$	$\pm 5,0$	± 765	± 882	± 504
n	15	15	9	14	14	8
Str.	24-55	32-64	14-29	427-2748	598-3198	273-1817

Der Mittelwert der Lymphozyten/mm³ war: 3567 $\pm$ 1878

Tabelle 6:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit Virusinfektionen in Prozent und absoluter RFC-Zahl in mm³.

4. Kinder mit primär nicht infektiösen Krankheiten

Die geringe Zahl der Fälle und die zum Teil tief in das Immunsystem eingreifende Therapie erlaubt nicht, diese Patienten in Gruppen zusammenzufassen. Die Ergebnisse sind deshalb für jeden einzelnen Fall angegeben.

a) Kinder mit malignen Erkrankungen:

Diagnose	Lymph./mm ³	% E - RFC		% EAC-RFC	E-RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
		a	p		a	p	
Lymphosarkom	1788	40	55		715	983	
Ewing-Sarkom	230	57	63	4	131	144	9
Rhabdomyosarkom	1551	46	46	15	713	713	232
Lymphogranulomat.	1459	26	44	10	379	642	145
ALL	1394	51	47		710	655	
ALL	3872	40	42		1548	1626	

Tabelle 7:

Einzelergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit malignen Erkrankungen in Prozent und absoluter RFC-Zahl in mm³.

b) Kinder mit primären Immundefizienzen:

Ein 2 1/2-jähriger Knabe mit WAS (Wiskott-Aldrich-Syndrom) wurde einmal vor und einmal nach Gabe von Transferfaktor (Charge A) untersucht:

	Lymph./mm ³	% E-RFC		% EAC-RFC	E-RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
		a	p		a	p	
15.4.74	1464	18	10		263	146	
8.10.74	1496	30	33	10	448	493	149
Diagnose	Lymphoz./mm ³	% E - RFC		% EAC-RFC	E-RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
		a	p		a	p	
Dysgammaglobulinämie (x-chromosom.)	6055	34	33	12	2058	1998	726
WAS	774	25	21	10	193	162	77
Agammaglobulinämie (BRUTON-Typ)	2941	38	60	8	1117	1764	235
Transitorische Hypogammaglobulinämie	6318	22	39	28	1389	2464	1769
Agammaglobulinämie+T-Zelldefekt	294	11	17	16	32	49	47
Kombinierte ID mit geringer Infektanfälligkeit	988	15	28	35	148	276	345

Tabelle 8:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit primären Immundefizienzen in Prozent und absoluter RFC-Zahl pro mm³.

c) Kinder mit "Autoimmun"-Erkrankungen:

Diagnose	Lymphozyt./mm ³	% E - RFC		% EAC-RFC	E-RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
		a	p		a	p	
Entercolitis reg.	2023	59	19		1193	384	
Purpura "Schönlein Hennach"	1760	37	55	12	651	968	211
	1262	47	48	10	593	606	126
Autoimm. Anämie	1188	11	16	30	130	190	356
Morbus STILL	1612	40	35		645	564	

Tabelle 9:

Ergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit "Autoimmun"-Erkrankungen in Prozent und absoluter RFC-Zahl pro mm³.

d) Verbleibendes Patientengut:

Umstritten ist, ob Dermatomyositis zu den Autoimmunerkrankungen gezählt werden kann (46, 68). Zwei untersuchte Kinder zeigten folgende Werte:

<u>Lymphoz./mm³</u>	<u>% E-RFC</u>		<u>% EAC-RFC</u>	<u>E-RFC/mm³</u>		<u>EAC-RFC/mm³</u>
	<u>a</u>	<u>p</u>		<u>a</u>	<u>p</u>	
1480	38	43	13	562	636	192
3600	25	26	18	900	936	648

Ein Knabe mit Epiphyseolysis capitis femoris wurde wegen der auffallend hohen Malignom-Morbidität in seiner Familie untersucht:

2326	9	26	-	209	604	-
------	---	----	---	-----	-----	---

(47 % Lymphozyten!)

Ein Knabe mit Erythema Nodosum, aufgetreten 6 Wochen nach einer eitrigen Tonsillitis, bei dem sich kein Hinweis auf Tbc ergab, zeigte folgende Werte:

3920	44	47	-	1724	1842	-
------	----	----	---	------	------	---

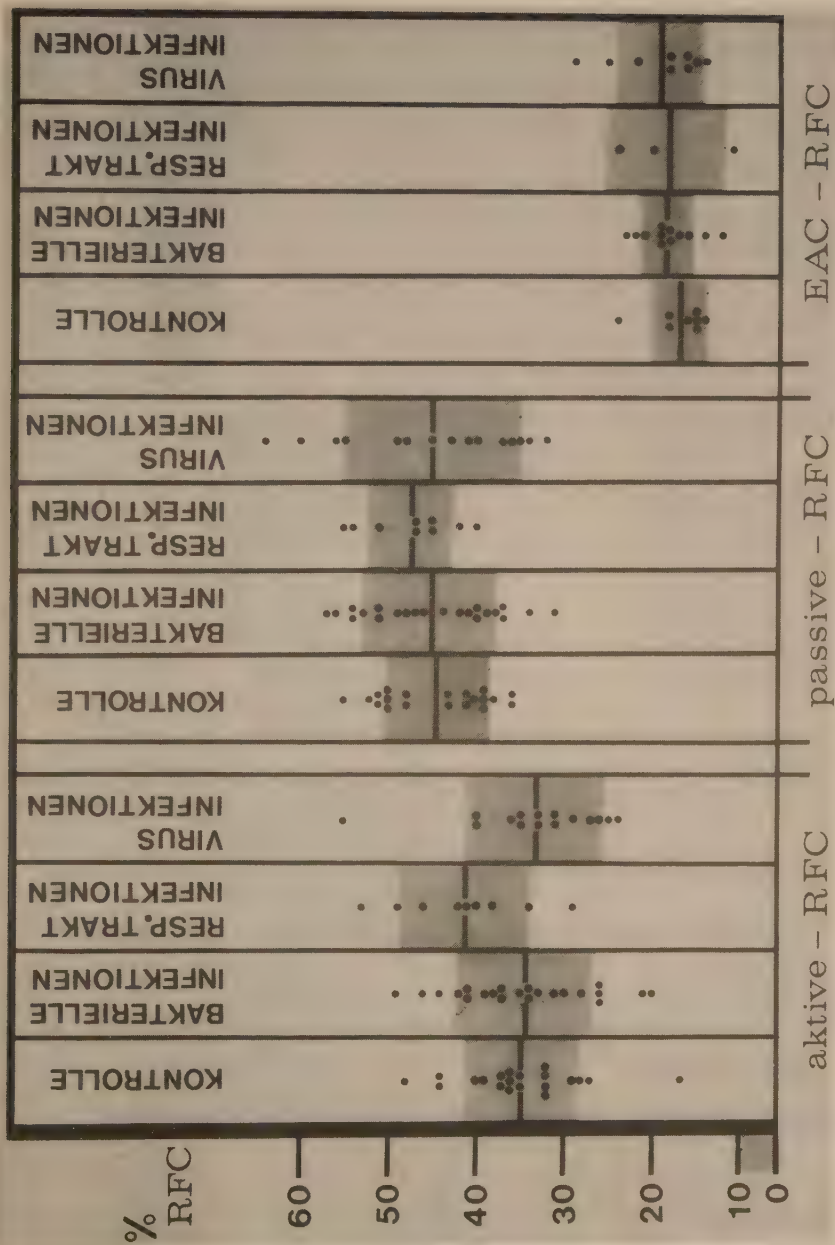


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Ergebnisse eigener Untersuchungen in Prozent. Die querverlaufenden Striche markieren jeweils den Mittelwert, die schraffierten Bereiche jeweils die Standardabweichung.

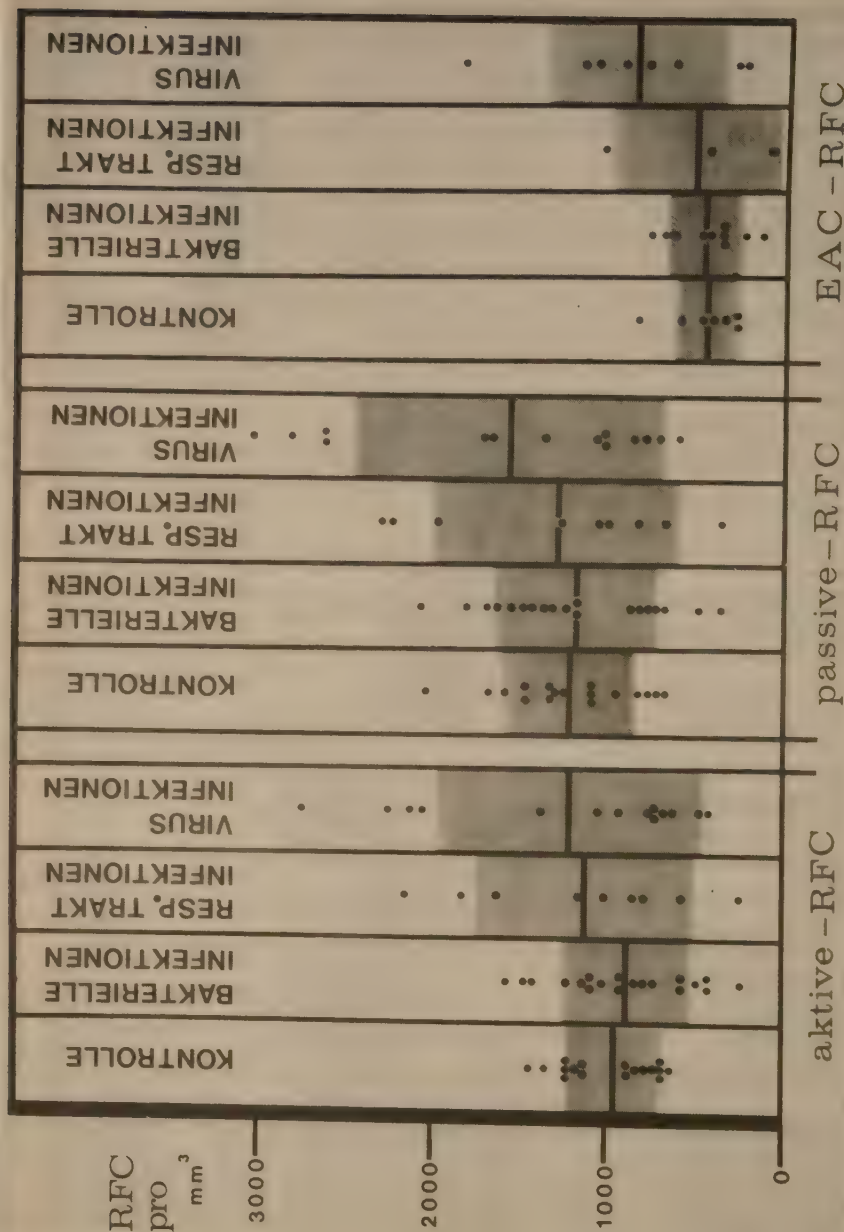


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Ergebnisse eigener Untersuchungen in absoluten Werten pro mm³. Kennzeichnung wie in Abbildung 5.

V. Ergebnisse anderer Untersucher; Analyse und Vergleich:

1. Methodische Varianten; Ergebnisse bei Gesunden:

Da die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von T- und B-Lymphozyten mit Hilfe des Rosettenverfahrens in der verfügbaren Literatur stark variieren, sollen zunächst die Methoden anderer Untersucher dargestellt werden. Tabelle 10, in der die wichtigsten Versuchsschritte mit Kennziffern bezeichnet sind, dient zur Verdeutlichung.

SEILER (57)		WYBRAN (78)		AIUTI (1)		HEIER (35)		WHO-Rep.(49)		eig.Arbeit	
p		a		p		p		p		a	p
①	Ficoll	Ficoll	Ficoll	Ficoll	Ficoll	Ficoll	Ficoll	Ficoll	Ficoll		
②	15'300 g	40'400 g	20'400 g	?	30'400 g	40'400 g	40'400 g	40'400 g	40'400 g		
③	PIS	PBS	Gelatin Veronal	MEM- Hepes	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS		
④	2 x	3 x	2 x	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x	3 x		
⑤	-	60'37°C	-	-	5'37°C	60'20°C	60'20°C	60'20°C	60'20°C		
⑥	-	FCS	-	-	FCS	FCS	FCS	FCS	FCS		
⑦	1 : 16	1 : 8	1 : 80	1 : 40	1 : 80	1 : 8	1 : 8	1 : 8	1 : 8		
⑧	30' 20°C	-	15' 37°C	5' 37°C	5'37°C	-	-	-	-		
⑨	5'140 g	5'200 g	5'200 g	5'160 g	5'200g	5'200 g	5'200 g	5'200 g	5'200 g		
⑩	-	-	4°C ü.N.	4°C ü.N.	4°C ü.N.	60' 20°C	60' 20°C	60' 20°C	60' 20°C		
⑪	man/Pip	?	man	man	man/Pip	man	man	man	man		
⑫	3	3	3	5	3	3	3	3	3		
⑬	1 : 50	-	1 : 80	-	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50	1 : 50		
⑭	-	-	15' 37°C	-	15'37°C	30' 37°C	30' 37°C	30' 37°C	30' 37°C		
⑮	5'140 ⁰ g		5'200 g	-	im Schüttler	im Schüttler	im Schüttler	im Schüttler	im Schüttler		
⑯	3	-	3	-	3	3	3	3	3		

FCS = fetal calf serum; man = manuell; Pip = mit Pipette; ' = Minuten;
a = aktive; p = passive; ü.N. = über Nacht.

Tabelle 10:

Methodische Varianten einiger Untersucher. Die Zahlen links beziehen sich auf die Untersuchungsschritte in Abbildung 7.

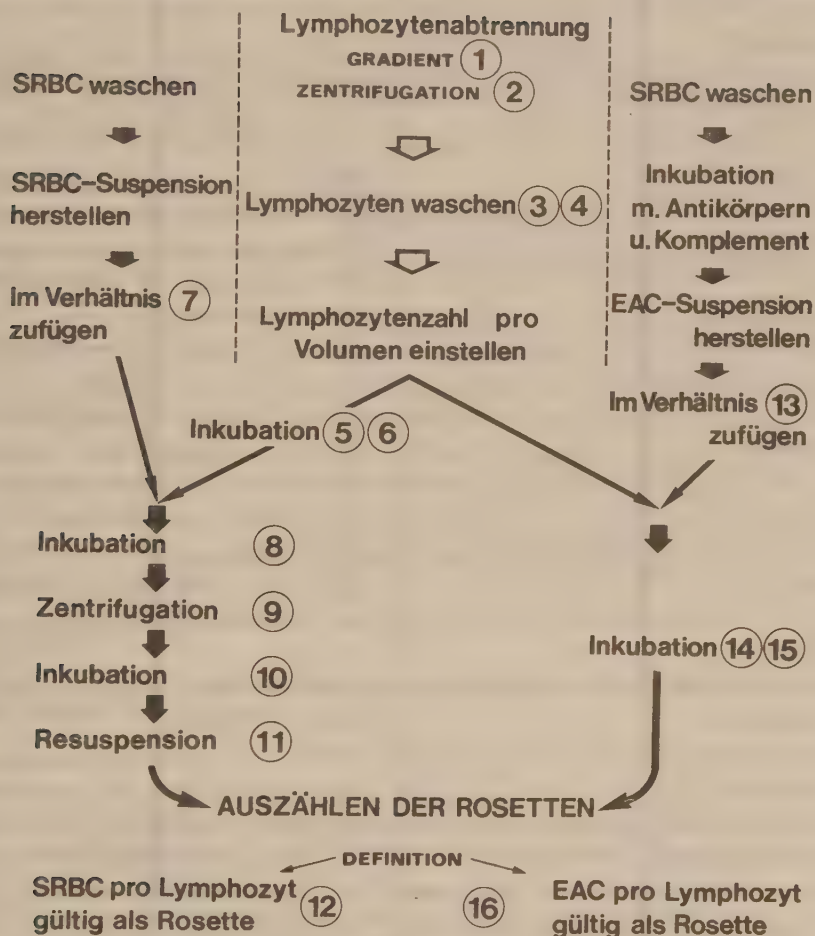
E - ROSETTENEAC - ROSETTEN

Abbildung 7: Verfahren zur Herstellung von E- und EAC-Rosetten. Die Ziffern beziehen sich auf die entsprechenden Versuchsschritte der Tabelle 10.

Autor	% E - RFC		% EAC-RFC
	a	p	
SEILER (57)	-	46,8 $\pm$ 14,5 (9)	26,7 $\pm$ 3,3 (8)
WYBRAN (78)	27,4 $\pm$ 6,1 (50)	-	-
STEEL (61)	-	57,0 (4)	-
AIUTI (1)	-	52,3 $\pm$ 7,2 (19)	23,3 $\pm$ 5,7 (18)
HEIER (33)	-	33,1 $\pm$ 9,9 (10)	-
SCHÖPF (56)	-	46,3 $\pm$ 8,1 (17)	-
WHO-report (49)	-	-	15,4
YU (84)	24,1 (26)	72,3 (46)	9,8 (14)
TALAL (65)	-	64,3 $\pm$ 13,7	16,7 $\pm$ 4,3
HOLM (35)	-	73,2 $\pm$ 5,1 (28)	20,2 $\pm$ 3,6 (28)
CHAPEL (13)	29	-	-
POTVIN (47)	-	71,5 (240)	-
LUCKASEN (39)	-	64,0 $\pm$ 13,8 (111)	17,2 $\pm$ 6,2 (41)
TACHIBANA (63)	34,8 $\pm$ 6,8	49,7 $\pm$ 10,7 (15)	29,9 $\pm$ 8,9 (15)
Eigene Arbeit	34,8 $\pm$ 6,8 (20)	44,5 $\pm$ 6,0 (20)	16,8 $\pm$ 3,2 (8)

Tabelle 11:

Ergebnisse anderer Untersucher in Prozent der RFC. Untersuchung von gesunden Personen. Zum Vergleich die Ergebnisse der eigenen Arbeit.

Die Ergebnisse dieser Untersucher und einiger anderer, die über ihre Methoden nicht bis in alle Einzelheiten Aufschluß gaben, zeigt Tabelle 11. In Klammern die Zahl der Probanden.

Angaben über Mittelwerte der Lymphozyten/mm³ machen nur wenige Autoren. Der Vollständigkeit halber seien auch noch diese Zahlen zitiert:

	Lymphozyt./mm ³	E - RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
		a	p	
TALAL (65)	2400 $\pm$ 800	-	-	-
HOLM (35)	1900	-	1400	440
POTVIN (47)	2062	-	1478	-
LUCKASEN (39)	-	-	1901	540
Eigene Arbeit	2675 $\pm$ 726	955 $\pm$ 269	1220 $\pm$ 571	446 $\pm$ 168

Tabelle 12:

Ergebnisse anderer Untersucher in absoluter RFC-Zahl pro mm³.
Untersuchung von gesunden Personen.

Weitere methodische Varianten stellen Untersuchungen dar, in denen Lymphozyten oder Erythrozyten mit verschiedenen Substanzen behandelt wurden. Sie dienten vor allem dazu, Aufschluß über den SRBC-Rezeptor zu bekommen und erbrachten eine unterschiedliche, substanzabhängige RFC-Ausbeute.

Behandelt man die Lymphozyten mit Neuraminidase, so wird die prozentuale Ausbeute an RFC größer. SEILER untersuchte 9 Probanden und fand folgende Werte (57):

ohne N.-dase	mit N.-dase	
46,8 ± 14,3	74,9 ± 9,3	% E-RFC

Auch wenn SRBC mit Neuraminidase behandelt werden, erhöht sich der Prozentsatz der E-Rosetten, allerdings auch die Zahl der autologen Rosetten (57). Nach DWYER und TAK YAN YU soll der Effekt der Neuraminidasebehandlung auf der Entfernung von Sialinsäuregruppen aus der Lymphozytenmembran beruhen, die in engem Zusammenhang mit dem SRBC-Rezeptor gesehen werden (19, 83).

Papain soll ebenfalls den postulierten SRBC-Rezeptor von einem ihn bedeckenden Material befreien. CHAPEL untersuchte 7 Probanden und fand, daß fast alle vitalen Lymphozyten nach Papainbehandlung E-Rosetten bildeten (12).

Eine Hemmung der Rosettenbildung läßt sich durch Hitze- einwirkung (56°C 30 min.) und Zugabe von toxischen Substanzen erzielen (57). Auch die Behandlung der Lymphozyten mit Trypsin, Phospholipase A, Immunsuppressiva und Anti-Lymphozyten-Serum hemmt oder unterbindet die Rosettenbildung (12, 57, 83).

2. Patienten mit bakteriellen oder viralen Infektionen:

Eine tabellarische Vergleichsaufstellung würde in die Irre führen, da Patientengut, Kontrollwerte und Ergebnisse der Untersucher zu sehr voneinander abweichen. WYBRAN et al setzt das Minimum an E-RFC auf 15 % (Kontrollmittelwert - 2x SA) für den "aktiven"-Test fest und findet bei 21 Patienten mit Virusinfektionen weniger, bei 20 Patienten mit bakteriellen Infekten dagegen mehr als diesen Wert (79).

AIUTI et al untersuchte Patienten mit Virus-Hepatitis, Masern, infektiöser Mononukleose, Parotitis epidemica und Herpes Zoster einerseits, Brucellose, Thyphus, rheumatischem Fieber, Endokarditis und Sepsis andererseits. Er führt die Fälle einzeln auf, woraus sich Mittelwert ±Standardabweichung errechnen lassen (1):

	% E - RFC (p)	% EAC-RFC
Kontrolle	52,3 <u>±</u> 7,2 (19)	23,4 <u>±</u> 5,7 (18)
Virusinfektionen	58,8 <u>±</u> 10,5 (25)	17,6 <u>±</u> 4,9 (32)
bakt. Infektionen	56,2 <u>±</u> 6,4 (18)	21,3 <u>±</u> 4,9 (18)

Die Erhöhung des E-RFC - Mittelwertes bei den Virusinfektionen ist vor allem durch 6 Mononukleosefälle ($\bar{x}$ = 70 ± 9,6 %) bedingt. Ohne diese beträgt der Mittelwert 55,2 ± 8,2 %, entspricht also dem der Patienten mit bakteriellen Infektionen. Außer dieser auffälligen Abweichung waren die Ergebnisse der anderen Krankheitsgruppen gleichmäßig gestreut.

SHELDON et al findet ebenso einen Anstieg der E-RFC bei Mononukleose (60):

Kontrolle:	30,3 <u>±</u> 7,5 (6)
Mononukleose:	45,4 <u>±</u> 9,1 (8)

Beide Autoren bezeichnen die bei Mononukleose vermehrt auftretenden E-RFC als die für das akute Stadium charakteristischen, atypischen Zellen.

HØIBY und MATHIESEN untersuchen je neun Patienten zwischen 7 und 14 Jahren mit Mukoviscidose, wovon eine Gruppe mit Pseudomonas aeruginosa infiziert ist (34):

	Lymphoz./mm ³	% E - RFC (p)	% EAC - RFC
mit	3940 <u>±</u> 1056	62 <u>±</u> 7,8	42 <u>±</u> 7,0
ohne	2460 <u>±</u> 675	65 <u>±</u> 9,0	38 <u>±</u> 7,9

Pseudomonas aeruginosa Infektion

Die Untersuchung einer Korrelation zwischen präzipitierenden *Pseudomonas-aeruginosa*-Antikörpern und Verteilung der Lymphozytenpopulationen brachte nur für E-RFC/mm³ eine signifikant positive Abhängigkeit.

WILLIAMS und MESSNER geben für jede Infektion (außer Mononukleose) eine initiale Erniedrigung der E-RFC an. Eine Erhöhung der EAC-RFC soll sich im Verlaufe einer bakteriellen Infektion einstellen (73).

3. Patienten mit malignen Erkrankungen:

POTVIN et al findet bei verschiedenen Malignompatienten (außer solchen mit Adenokarzinomen) eine signifikante Verringerung prozentualer und absoluter Werte der T-Zellen. Besonders deutlich war der Unterschied bei Rezidiven und im progressiven Stadium (47):

	% E - RFC (p)	E - RFC/mm ³
Krebspatienten	57,2 (.25)	788 (25)
Kontrolle	71,5 (240)	1478 (240)

WYBRAN und FUDENBERG schließen aus ihren Untersuchungen, daß die Zahl "aktiver" E-RFC zwar stark vom klinischen Zustand abhängt, insgesamt aber prozentual niedriger ist, wobei der absolute Wert/mm³ nicht notwendig erniedrigt sein muß (79). Ein Ansteigen der "aktiven"-E-RFC fällt nach ihren Beobachtungen mit dem Auftreten tumorzelltoxischer Lymphozyten zusammen (80).

Zu anderen Ergebnissen kommt TACHIBANA et al bei Malignompatienten in fortgeschrittenem Stadium (63):

	% E - RFC (p)	% EAC - RFC
Kontrolle (20)	58,8 $\pm$ 7,0	39,3 $\pm$ 6,4
fortgeschr. Pat. (12)	71,3 $\pm$ 11,5	28,7 $\pm$ 13,3
Endstadium Pat. (3)	22,0 $\pm$ 10,0	79,0 $\pm$ 15,6

Bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) werden von den meisten Autoren übereinstimmende Ergebnisse angegeben. Einer relativen Verminderung der E-RFC im Gesamtlymphozytenpool steht eine starke prozentuale Zunahme der EAC-RFC und auch EA-RFC gegenüber. Tatsächlich handelt es sich also nicht um einen T-Lymphozyten-Defekt, sondern um eine starke Proliferation defekter, unausgereifter B-Lymphozyten. Sie haben eine gegenüber normalen B-Zellen verkürzte Halbwertszeit und verminderte Fähigkeit in Ig-sezernierende Zellen zu reifen (36, 57, 73, 79, 82).

Bei Morbus Hodgkin zeigt sich eine mäßige Vermehrung der B-Zellen, vor allem jener, die mit Ig-G beladen sind. Ihre Aktivität richtet sich möglicherweise gegen eigene T-Lymphozyten, die jedoch quantitativ nicht vermindert sind. Je nach Krankheitsstadium zeigen sie aber eingeschränkte und verzögerte blastoide Transformation bei in-vitro-Tests. Ähnlichkeiten dieser Krankheit mit graft-versus-host-Reaktionen sind beschrieben, die Stellung der B- und T-Lymphozyten zueinander scheint der in einem "Bruderkrieg" ähnlich (19, 30, 36, 73).

4. Patienten mit Immundefizienzen:

Je nach Art der primären oder sekundären Immundefizienz unterscheidet sich Verteilung von Lymphozytenpopulationen in ihrer Abweichung von der Norm.

So sind bei der x-chromosomal-rezessiven Agammaglobulinämie (BRUTON) keine B-Zellen nachzuweisen, wohingegen bei Agammaglobulinämien anderen Typs normale B-Zellmengen die Regel

sind (73, 81) (siehe auch Abb. 8 S. 49). Der prozentuale Anteil der T-Zellen ist bei diesen ebenfalls normal (70), in einigen Fällen aber auch leicht erhöht (81). Bei zwei Patienten mit Hypogammaglobulinämie findet PREUD'HOMME eine prozentuale Erhöhung von B-Zellen selektiv für einzelne Ig-Klassen (48).

Die Untersuchungen von Patienten mit dem WAS (Wiskott-Aldrich-Syndrom) zeigen eine starke prozentuale Erniedrigung der T-Zellen (insbesondere der "aktiven"-E-RFC), bei gleichbleibendem Anteil an B-Zellen (57, 78, 81). Bei Patienten mit Thymusaplasie (DIGEORGE) sind T-Zellen nicht nachweisbar, wohl aber ist die B-Zellpopulation stark überrepräsentiert und erreicht bis über 80 % bei Normwerten um 26 % (23, 25).

5. Andere mit dieser Methode untersuchte Krankheiten:

Bei rheumatoider Arthritis finden sich keine signifikanten Unterschiede von der prozentualen Norm, wohl aber eine Verringerung der absoluten T- und B-Zellen/mm³. Lupus erythematoses bringt eine deutliche prozentuale Erniedrigung der T-Zellwerte (73, 81, 82).

TALAL et al findet bei 24 Patienten mit Sjörgens Syndrom in acht Fällen eine prozentuale Verminderung der T-Zellen, bei der Mehrzahl der Patienten sind die Prozentwerte für B-Zellen erhöht (65).

SCHÖPF untersuchte 17 Patienten mit Neurodermitis atopica und stellte eine signifikante Korrelation zwischen Schweregrad der Krankheit, Ig-E Serumkonzentration und prozentualem Abfall der E-RFC fest (56).

LUCKASEN et al findet bei 19 Patienten mit Allergiedermatitis T- und B-Zellprozent im unteren Bereich der Norm. In allen Fällen brachte eine Lymphopenie eine absolute Verminderung der beiden Populationen (39).

Schließlich seien noch die Ergebnisse von FERGUSON et al erwähnt, der unterernährte Kinder und dystrophe Neugeborene untersuchte. Bei beiden Gruppen ist die Prozentzahl der "passiven" E-RFC stark erniedrigt (22):

Unterernährte Kinder:	16,6 $\pm$ 2,7	(10)
Kontrollgruppe:	59,7 $\pm$ 1,4	(10)
Dystrophe Neugeborene:	49,2 $\pm$ 2,0	(10)
Kontrollgruppe:	65,1 $\pm$ 1,4	(10)

(Mittelwerte in Prozent + statistischem Fehler; in Klammern die Zahl der Probanden)

VI. Diskussion:

1. Diskussion der Ergebnisse eigener Untersuchung:

a) Kritische Bemerkungen zur verwandten Methode

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchung waren in der Literatur die verschiedenen methodischen Aspekte des Rosettenverfahrens noch wenig diskutiert oder systematisch untersucht worden. Mehrere Untersucher haben sich aber in der letzten Zeit mit diesem Thema beschäftigt, und ich möchte die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der unterschiedlichen Handhabung der Methode kritisch werten:

Die relativ niedrige Prozentzahl "passiver" E-RFC führe ich auf die kurze Inkubationszeit bei Zimmertemperatur und das geringe Verhältnis von nur 8 SRBC pro Lymphozyt zurück. Die besten Ergebnisse werden bei 4°C Inkubation für 20 - 25 Stunden und einem Verhältnis SRBC zu Lymphozyt von mehr als 50 : 1 erzielt (49, 82). Die bei der Auszählung häufig auftretenden morulaähnlichen SRBC-Anhäufungen zählte ich nicht als Rosette, da nicht zu erkennen war, ob ein Lymphozyt in ihrem Zentrum lag oder ob es sich um eine spontane Agglutination handelte. Dies mag eine weitere Verminderung meiner Ergebnisse bewirkt haben.

Für die vergleichsweise höhere Prozentzahl "aktiver"-E-RFC liegt die Ursache sicherlich im Fehlen der 37°C Inkubation. Durch diese werden möglicherweise die den "aktiven" E-RFC nicht angehörenden Zellen selektiv ausgesondert (siehe auch S. 24).

Der EAC-Rosettentest entspricht der allgemein verwandten Methode, und die Ergebnisse dieser Untersuchung weichen kaum von denen im SPECIAL TECHNICAL REPORT (49) genannten

ab. In diesem wird auf die Schwierigkeit hingewiesen, Monozyten, die ebenfalls EAC-Rezeptoren haben, bei der Auszählung der Rosetten als solche zu berücksichtigen. TAK YAN YU vermutet hinter den hohen prozentualen Ergebnissen anderer Autoren ebenfalls einen für Lymphozyten gehaltenen Monozytenanteil (82).

Bei keiner Methode zur Quantifizierung von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut ist eine höhere Ausbeute als 90 % möglich und ab 70 % wird das echte Verhältnis der beiden Populationen wiedergegeben (49).

Die Zusammenziehung der Werte dieser Untersuchung von "passiven" E-RFC und EAC-RFC ergibt im Mittel für:

Kontrollgruppe	62,3 %
Infektpatienten (bakt.)	64,5 %
Infektpatienten (viral)	63,5 %

Über die 70 % Gesamtausbeute wäre ich gelangt, wenn ich mit Hilfe anderer Verfahren (Immunfluoreszenz- bzw. radioaktiver Ig-Markierung alle B-Lymphozyten erfaßt hätte, deren Anteil 20 - 30 % der Gesamtlymphozyten ausmachen soll (14, 23, 30, 82). Aus technischen Gründen war dies im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. So gehe ich davon aus, daß mein Ergebnis des EAC-RFC-Testes ($16,8 \% \pm 3,3$) rund 10 % der B-Lymphozyten nicht erfaßt, die an der Gesamtausbeute fehlen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung der quantitativen T- und B-Zell-Bestimmung sind also für die T-Lymphozyten aussagefähig. Die B-Lymphozyten wurden nicht in ihrer Gesamtheit erfaßt, sondern nur eine B-Zell-Untergruppe.

b) Wertung der Ergebnisse von untersuchten Patienten:

Die Kinder mit Infektionen wurden in drei verschiedene Gruppen zusammengefaßt, um zu prüfen, ob sich signifikante Unterschiede bei einer statistischen Auswertung im Vergleich zur Kontrollgruppe ergeben.

Die Mittelwerte der prozentualen und absoluten Lymphozytenanteile liegen bei allen Gruppen für die drei durchgeführten Rosettentests nahe zusammen und weichen nicht signifikant voneinander ab (Student t-Test) (siehe auch Abb. 5 und 6). Die Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen zeigt also nach den Ergebnissen dieser Arbeit keine Korrelation mit dem klinischen Bild. Die Überprüfung etwaiger Zusammenhänge mit anderen Parametern erbrachte auch keine Ergebnisse. Gemeint sind hier unter anderem: Werte des Differentialblutbildes; Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit; rektale Temperatur; Art und Dauer der Therapie. Dennoch möchte ich auf Abweichungen der Mittelwerte einzelner Gruppen eingehen:

Bei den Kindern mit Virusinfektionen war der Prozentanteil an "aktiven" E-RFC nicht so deutlich erniedrigt wie es WYBRAN (79) beobachtete. Abgesehen von möglichen methodischen Ursachen (siehe S. 24), erscheint mir die relative Erhöhung des Mittelwertes "aktiver" (und auch "passiver") $E-RFC/mm^3$ interessanter. Durch die in der Regel bei Virusinfektionen auftretende Lymphozytose ist also die tatsächlich verfügbare Zahl an "aktiven" T-Lymphozyten, auch bei geringeren Prozentanteilen nicht notwendig erniedrigt.

Der vergleichsweise höhere Mittelwert an "aktiven" E-RFC prozentual und absolut gesehen, bei den Kindern mit bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes fällt ebenfalls auf. Die bei diesen Krankheitsbildern häufige Verflechtung von vorausgegangener Virusinfektion mit nachfolgender bakterieller Superinfektion hat offensichtlich ein Ansteigen der Zahl immunkompetenter "aktiver" T-Lymphozyten bewirkt.

Bei der Auftrennung der Kinder mit bakteriellen Infektionen in zwei Altersgruppen ergaben sich ebenfalls geringe Unterschiede. Die älteren Kinder hatten einen etwas höheren Prozentanteil "aktiver" E-RFC und einen bei einer im Mittel um $100/\text{mm}^3$ niedrigeren absoluten Gesamt-Lymphozytenzahl nicht entsprechend erniedrigten absoluten Mittelwert (siehe S.27). Der Grund dafür könnte ein höherer Anteil an "memory"-Zellen sein, über den ältere Kinder sicherlich auf Grund der häufigeren antigenen Exposition verfügen. Bei diesen können also dann bei einer Infektionskrankheit mehr "memory"-Zellen mit dem "aktiven" Test erfaßbar werden als bei jüngeren Kindern.

Bei den drei untersuchten Kindern mit Mononukleose fand sich nicht der erwartet hohe Anteil an T-Lymphozyten. Eine ganz sichere morphologische Unterscheidung der bei dieser Infektion auftretenden typischen monozytoiden Zellen ist beim Auszählen der Rosetten zwar nicht möglich; ich schloß aber all jene RFC von der Zählung aus, die deutlich größer waren und eine andere Kern/Plasma-Relation zeigten als typische Lymphozyten.

Die äußerst geringe Zahl der Kinder mit malignen Erkrankungen, die untersucht wurden, ließe eine Wertung der Ergebnisse nur im Einzelfall zu. Da aber außer in einem Fall (Nr. 35) keine Abweichung von der normalen Streuung innerhalb der Kontrollgruppe gegeben ist und andere Untersucher mit höheren Fallzahlen zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen (siehe S. 40), scheint eine Diskussion der eigenen Ergebnisse nicht sinnvoll. Der auch hier beobachtete normale Anteil von T-Lymphozyten stimmt mit den Ergebnissen anderer Untersucher überein (19, 71, 79).

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die starke Erniedrigung für E-RFC (prozentual und absolut) des Kindes mit auffallend hoher Malignom-Morbidität in der Familie (Fall Nr. 57). Der offensichtliche quantitative Defekt der

T-Lymphozytenpopulation, deren Aufgabe auch die Tumorerwachung ist, könnte auf eine (vererbte?) Malignom-Disposition schließen lassen.

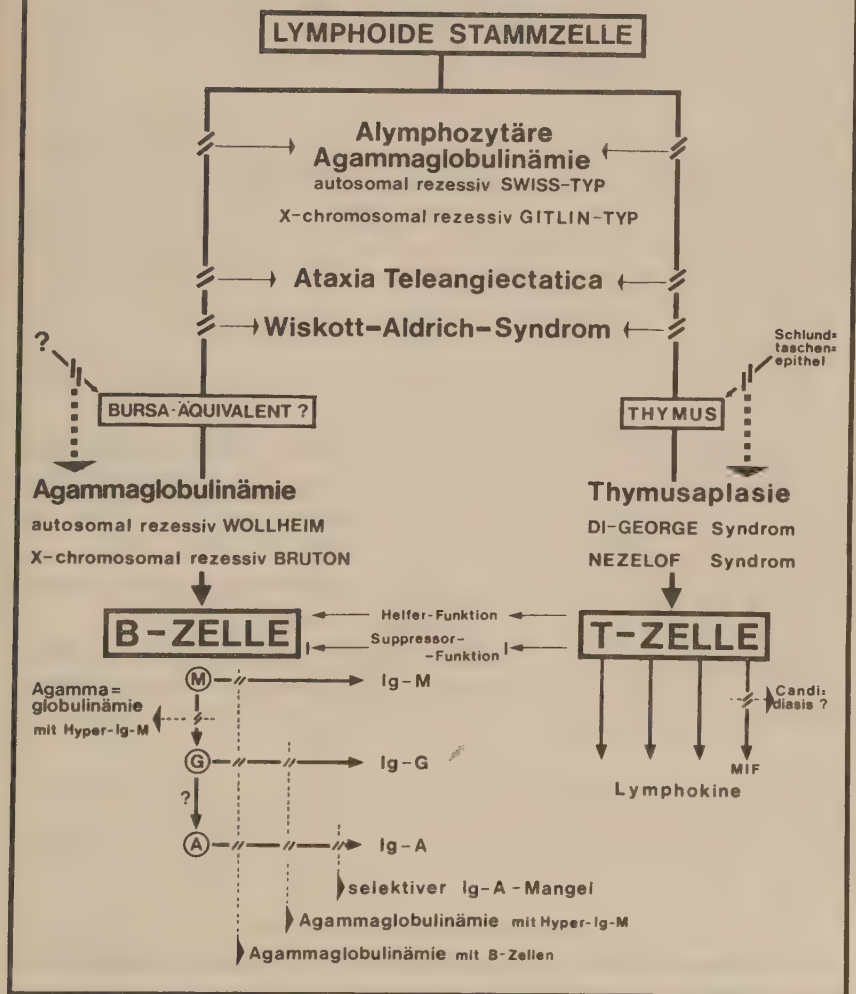
An einem Zusammenhang zwischen verminderter Leistung des Immunsystems und Malignom-Morbidität wird jedenfalls nicht gezweifelt, was auch die häufige Verknüpfung maligner Erkrankungen mit Immundefizienzen deutlich macht (69).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Kindern mit Immundefizienzen ergaben sich die auffallendsten Abweichungen von der Norm. Je nach Grundkrankheit und Ausprägung waren prozentuale und absolute Verschiebungen in der T- und/oder B-Zellen-Population zu beobachten. Es kann nicht Aufgabe dieser Arbeit sein, auf die verschiedenen Arten von Immundefizienzen mit ihrer komplexen immunologischen Situation und von Fall zu Fall unterschiedlichen Ausprägung näher einzugehen. Zur Verdeutlichung der möglichen primären Entwicklungsstörungen des Immunsystems und ihren Auswirkungen auf Lymphozytenkompartimente diene folgende Skizze.

Abbildung 8: Primäre Immundefekte

Die schräg gestellten Doppelstriche kennzeichnen den Ort der möglichen Unterbrechung bei der Entwicklung von der lymphoiden Stammzelle zur reifen T- oder B-Zelle bzw. andere Reifungsdefekte.

Primäre Immundefekte



Besondere Beachtung verdient der Fall des Kindes mit WAS (Fall Nr. 33 und 75), welches mit 6 Monaten Intervall zweimal untersucht und in der Zwischenzeit mit Transferfaktor* behandelt wurde. Es zeigte bei der zweiten Untersuchung eine deutliche Erhöhung der E-RFC, gekoppelt mit einem sich bessernden klinischen Zustand. Die Möglichkeit, den Erfolg der Transferfaktorbehandlung (nicht alle Patienten reagieren darauf) frühzeitig an einem Ansteigen der E-RFC zu erkennen, hat sich in diesem Fall anscheinend bestätigt (78).

Die einzelnen Ergebnisse bei Kindern mit Autoimmunerkrankungen lassen sich schwer deuten, da über Zusammenhänge zwischen Lymphozytenpopulationen und solchen Erkrankungen noch keine ausreichenden Kenntnisse bestehen. Die Ätiologie ist bei einzelnen Erkrankungen unterschiedlich und in den wenigsten Fällen hinreichend geklärt. Vieles spricht für eine genetisch determinierte Mutation immunkompetenter Zellen, die Entstehung sogenannter "forbidden clones" also (19, 24). So käme es zum Auftreten von autoreaktiven Lymphozyten, die keine Toleranz mehr gegenüber "Autoantigenen" haben. Bei der herausragenden Rolle der T-Lymphozyten hätten Veränderungen in diesem Kompartiment auch Auswirkungen auf die B-Lymphozyten durch veränderte Aktivierung, Supprimierung und Toleranzverhalten (21). Andererseits könnte eine unzureichende Immunantwort auf eingedrungene Antigene zu einer Modifikation körpereigener Zellen führen, gegen die das Immunsystem autoaggressiv reagiert (29). Die Folge wäre ein vermehrtes Auftreten von (auto)-immunkompetenten Zellen (Fall 3 ?). Wenn nicht der aktivierende Einfluß der T-Lymphozyten krankmachend wirkt, sondern durch das Fehlen einer T-Lymphozyten-Subpopulation mit Kontroll- und Suppressorfunktion autoimmunologische Phänomene aufträten, könnte dies möglicherweise auch quantitativ erfaßbar sein (24). (Fall Nr. 74 ?)

* Ein dialysierbarer zytoplasmatischer Faktor aus sensibilisierten Lymphozyten, der durch Aktivierung und Proliferationsinduktion spezifischer T-Zellen immunologische Potenz vom Spender auf den Empfänger überträgt (28, 72, 78).

2. Quantitative Untersuchungen von Lymphozytenpopulationen und ihre Bedeutung für die Klinik:

Die quantitative Verteilung von Lymphozytenpopulationen wurde bisher vorwiegend bei solchen Krankheiten untersucht, deren Ursache oder Entwicklung in engem Zusammenhang mit dem Funktionszustand des Immunsystems gesehen wird.

Patienten mit Infektionskrankheiten verschiedener Genese waren Ziel mehrerer Untersuchungen (1, 34, 60, 79). Die statistische Auswertung der Ergebnisse erbrachte bei den einzelnen Untersuchern differierende Resultate. Eine klinische Relevanz für die Beurteilung eines einzelnen Patienten mit einer Infektionskrankheit ist zur Zeit noch nicht gegeben und dürfte bei der relativ großen Streuung der Werte mit den angewandten Methoden allein auch in Zukunft nicht zu erwarten sein.

In einer Arbeit wurden die Auswirkungen von Unterernährung und intrauteriner Mangelversorgung auf Lymphozytengruppen untersucht und eine statistisch signifikante Verminderung von T-Lymphozyten bei den Probanden aufgezeigt (22). Die untersuchten Kinder waren klinisch gesund und so könnten die Ergebnisse auf eine bei Unterernährung bekannte Infektdisposition hinweisen. Wenn im akuten Stadium einer Infektion Abweichungen in der prozentualen Verteilung von Lymphozytengruppen stark gestreut haben und daher nicht interpretierbar waren, so könnten niedrigere Werte von immunkompetenten Zellen vor einer Infektion Zeichen für geringere Resistenz sein.

In dieselbe Richtung weisen auch die Ergebnisse bei Patienten mit Immundefizienzen, zu deren Krankheitsbild sekundär immer auch schwere Infektionen zählen. Die Untersuchung solcher Patienten auf ihre quantitative Lymphozytenverteilung wurde häufig durchgeführt (2, 23, 48, 69, 70, 72, 78). Bei dem Verdacht auf eine Immundefizienz hat die Quantifizierung von T- und B-Lymphozyten, flankiert von anderen Untersuchungen,

fundamentale Bedeutung für die Diagnose und Klassifizierung. Nur sie kann Aufschluß geben, welches Lymphozytenkompartiment in welchem Ausmaß betroffen ist. Ebenso kann die Wirksamkeit eines Therapieversuches (z.B. mit Transferfaktor, Knochenmarktransplantation, Thymustransplantation oder Thymosin) durch quantitative Untersuchung der Lymphozyten überprüft werden. Dies trifft in erster Linie für Immundefizienzen, die das T-Zellkompartiment betreffen, zu (DiGeorge's Syndrom; Nezelof's Syndrom; Ataxia teleangiectatica; WAS). Eine Erhöhung der T-Zellzahlen, als Zeichen erfolgreicher Therapie, tritt vor einer erkennbaren Besserung des klinischen Zustandes auf (19, 76, 78).

Große Bedeutung wurde der Bestimmung von T- und B-Lymphozyten auch bei Patienten mit malignen Tumoren und Leukämien zugemessen (16, 30, 47, 59, 63, 79). Das Auftreten von Tumoren ist häufig mit Defekten der zellulären Immunität verknüpft. Ob dies Folge oder Ursache der Tumorentstehung ist, bedarf noch letzter Klärung, obwohl viele Untersuchungsergebnisse mehr für das Letztere sprechen (28, 79, 80). WYBRAN und POTVIN vermuten, durch periodische Quantifizierung der "aktiven" T-Lymphozyten bei Krebspatienten in Remission frühzeitig das Auftreten von Rezidiven und/oder Metastasen an einem prozentualen Abfall dieser Zellen erkennen zu können (47, 79). Obschon die Ergebnisse der Untersuchungen von Krebspatienten unterschiedlich sind, könnte eine weitere Forschung in dieser Richtung die quantitative Bestimmung von Lymphozytenpopulationen für die screeningmäßige Erkennung einer Disposition oder von Rezidiven bedeutsam machen.

Auch Krankheiten, die weniger als Folge einer eingeschränkten als vielmehr einer "entgleisten" Funktion des zellulären oder humoralen Immunsystems zu sehen sind, wie allergische und rheumatoide Syndrome, wurden untersucht (18, 23, 30, 48, 70). Ergebnisse mit eindeutiger klinischer Korrelation ließen sich aber nicht erbringen. Nur im Einzelfall kann die Quantifizierung

ung von Lymphozytengruppen möglicherweise mit Aufschluß über Ausprägung und aktuelle Aktivität eines Leidens geben (19).

3. Die Brauchbarkeit des "Rosetten-Tests" zur Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen:

Die generelle klinische Anwendbarkeit des Rosettenverfahrens zur Quantifizierung von T- und B-Lymphozyten scheint fraglich angesichts der großen Variabilität der Untersuchungsergebnisse. Das Rosettenverfahren ist keine genaue quantitative Methode, semiquantitativ aber sehr wohl reproduzierbar und so sind Ergebnisse einzelner Untersuchungen, isoliert gesehen, sicher verwertbar. Wenn aber eine verbreitete Anwendung Eingang finden soll, so müßte Folgendes berücksichtigt werden:

Das von den meisten Untersuchern angewandte "passive" Verfahren sollte die gesamte T-Lymphozytenpopulation markieren und im Idealfall Ergebnisse nahe an 70 % erbringen. Der "aktive" Rosettentest erfaßt nur einen Teil der T-Lymphozyten, deren Natur und Bedeutung noch genauerer Erforschung bedarf. Mit dem EAC-Rosettentest wird ebenfalls nur eine Subpopulation der B-Lymphozyten identifiziert.

Um eine allgemeingültige Vergleichsmöglichkeit der Ergebnisse des Rosettenverfahrens zu bekommen, bedarf es einer Standardisierung der Methode und Interpretation der Resultate. So sollten z.B. EAC-RFC deutlich als Teilgruppe der B-Lymphozyten bezeichnet und nicht mit diesen gleichgesetzt werden (39, 50, 65).

Da Schwankungen der prozentualen Anteile "passiver" E-RFC bei demselben Spender von einem Tag zum anderen beobachtet wurden (26) und je nach Methode 10 - 20 % betrugen (61), sollten die besser reproduzierbaren "aktiven" E-RFC noch eingehender untersucht und vermehrt als Parameter verwandt

werden. Die Angaben der Ergebnisse sollten immer in Prozent und als absoluter Wert/mm³ erfolgen. Etwaige Balanceänderungen der Anteile immunkompetenter Lymphozyten sind von den Prozentwerten, mögliche Größenveränderungen ihres Gesamtpotentials von den absoluten Werten abzulesen.

Die Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen kann zur Zeit nur zusätzlich zu anderen Untersuchungen von Wert für die Klinik sein und Einblick in die Funktion des Immunsystems geben. Mindestens ist die Zahl der Lymphozyten/mm³ und, wenn möglich, deren Größe zu bestimmen. Vervollständigen können das Bild, je nach betroffenem Immunsystem, Hautteste, Lymphozytentransformationsteste (mit Mitogenen und Antigenen), der Makrophageninhibitionstest sowie die quantitative Bestimmung der Immunglobuline, Antikörpertiterbestimmungen und Prüfungen des Komplement- und Granulozytensystems.

Von weiteren Ergebnissen der Forschung, die Relationen zu klinischen Daten setzen werden, wird es abhängen, ob das wenig aufwendige Rosettenverfahren im besondern und die quantitative Bestimmung von Lymphozytenpopulationen im allgemeinen noch mehr Bedeutung für die Klinik erlangen.

VII. Zusammenfassung:

Mit einer von WYBRAN (76) beschriebenen, geringfügig modifizierten Methode wurden 19 gesunde Kontrollpersonen und 67 Patienten an der Haunerschen Universitäts-Kinderklinik München auf ihre Anteile von T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut untersucht.

Die Werte der Kontrollgruppe waren 34,8 $\pm$ 6,8 %
(955 $\pm$ 269/mm³) für den "aktiven"- und 44,5 $\pm$ 6,0 %
(1220 $\pm$ 371/mm³) für den "passiven"-E-Rosettentest und
16,8 $\pm$ 3,2 % für den EAC-Rosettentest.
(446 $\pm$ 168/mm³)

Mit dieser Kontrollgruppe wurden die Werte von ebenfalls in Gruppen zusammengefaßten Kindern mit bakteriellen Infektionen (22), bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes (8) und Virusinfektionen (15) verglichen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede nach dem Studentt-Test.

Kinder mit Tumoren (4), ALL (2), primären Immundefizienzen (7) und Autoimmunerkrankungen (5) wurden ebenfalls untersucht. Die Werte dieser Patienten zeigten je nach Krankheitsbild erhebliche Abweichungen von Mittelwert und normaler Streuung der Kontrollgruppe.

Eine eingehende Darstellung methodisch verschiedener Untersuchungen in der Literatur und ein Vergleich mit den in diesen Untersuchungen erbrachten Ergebnissen wurde angestellt.

Die Frage nach der klinischen Bedeutung der Quantifizierung von Lymphozytenpopulationen konnte nur für Patienten mit Immundefizienzen uneingeschränkt bejaht werden. Eine Bedeutung für die Früherkennung von Rezidiven und einer Disposition zu malignen Erkrankungen ist wahrscheinlich. Bei dem komplexen Bild der Autoimmunerkrankungen kann nur in einzelnen Fällen durch quantitative Untersuchung der Lymphozytenpopulationen ein besseres Verständnis der Ätiologie oder des Verlaufs erreicht werden.

Der Rosettentest ist zur quantitativen Untersuchung von Lymphozytenpopulationen brauchbar und wenig aufwendig. Er sollte exakt standardisiert werden, wenn er als klinisch bedeutsames Verfahren Eingang finden soll.

VIII. Anhang:

Die folgenden Tabellen I bis VI zeigen die einzelnen Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten.

Die Nummer entspricht der im Untersuchungsprotokoll festgehaltenen laufenden Patienten- bzw. Fallnummer.

Nr.	Diagnose/Erreger	Leukozyten /mm ³	Lymphozyten %	Lymphozyten /mm ³	% E-RFC		% EAC-RFC		E - RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
					n	p	a	p	a	p	
5	lok.; HWI/Sta, Ps, Str.	13400	22	2948	49	49	-	-	1444	1444	-
6	lok.; hämat/Sta, Ent, Sal	6700	50	3350	30	54	-	-	1005	1809	-
9	eitr. Tons./Str, Kleb	9100	28	2002	39	40	-	-	780	800	-
15	Meningitis/Men. kok	8000	15	1200	41	41	-	-	492	492	-
17	Sepsis/Col, Ent, Kleb	-	-	-	46	48	-	-	-	-	-
24	eitr. Bron; HWI/ps	-	-	-	28	31	-	-	-	-	-
29	(siehe Nr. 15)	8600	42	3612	44	47	-	-	1589	1697	-
49	TBC	12100	22	2662	35	51	-	-	931	1357	-
55	Osteomyel./Sta, Str.	5100	63	3213	34	37	-	-	1092	1188	-
61	Infektharthritis/ ?	12200	27	3294	37	40	-	-	1218	1317	-
67	Osteomyel./ ?	6550	11	720	31	51	19	19	237	367	136
70	Sepsis / ?	8550	24	2052	21	42	18	18	430	861	369
72	Scharlach	16600	12	1992	37	37	19	19	737	737	378
81	lok./ Sta	9100	32	2912	20	51	16	16	582	1458	465
82	HWI / Coli	13100	-	-	-	53	22	22	-	-	-
83	HWI / Coli	-	-	-	42	44	23	23	-	-	-
92	HWI / Ent	9100	38	3458	33	34	14	14	1141	1175	484
93	HWI / Coli	11800	35	4130	26	38	17	17	1073	1569	702
94	HWI / Coli	6900	46	3174	26	39	12	12	825	1237	380
95	Meningitis/Häm. infl.	13300	28	3724	38	56	21	21	1415	2085	782
97	HWI/Ps, Ser/Col	5550	22	1221	34	57	19	19	415	695	232

Nr.	Diagnose/Erreger	Leukozyten /mm ³	Lymphozyten %	Lymphozyten /mm ³		% E-RFC		% EAC-RFC	E - RFC/mm ³		EAC-RFC/mm ³
				a	p	a	p		a	p	
99	Meningitis / ?	12250	29	3552	26	46	18	923	1633	639	
100	Otitis / ?	4900	29	1421	41	54	-	582	767	-	
Σ + SA n				2664	34,4	45,2	18,2	890	1196	457	
				+999	+7,9	+7,5	+3,1	+378	+474	+204	
				19	22	23	12	19	19	10	

(Sta = Staphylokokken; Ps = Pseudomonas aeruginosa; Str = Streptokokken; Ent = Enterokokken;
 Sal = Salmonellen; Kleb = Klebsiellen; Men.kok = Meningokokken; Coli = Escherichia coli; Ser =
 Serratia; ? = kein Erregernachweis; HWI = Harnwegsinfektion; lok. = Hautinfektion; hamat. =
 positive Blutkultur)

Tabelle I :

Einzelsergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit bakteriellen Infektionen.

Nr.	Diagnose/Erreger	Leukozyt. /mm ³	Lymphozyten % /mm ³	% E - RFC a	p	% EAC-RFC	E - RFC/mm ³ a	p	EAC-RFC/mm ³
7	Pneumonie / ?	9800	21	2058	49	51	1008	1049	-
11	eitr. Bronch./Ent	7500	54	4050	53	55	2146	2227	-
19	Pneumonie / ?	8200	21	1722	34	40	585	688	-
25	Bronch.; Sinus/Str	5400	32	1728	46	47	794	812	-
28	Pneumonie/Str	5300	53	2809	42	45	1179	1264	-
31	(siehe Nr. 25)	8850	24	2124	40	47	849	998	424
56	Bronch./Sta	8500	54	4420	41	45	1812	1989	-
73	Bronchopneum./Sta	5150	16	824	29	42	238	346	90
91	Bronchitis / ?	26600	16	4256	38	54	1617	2298	1021
$\bar{x}$			2665	41,3	47,3		1136	1296	
+ SA			+1292	+7,4	+5,1		+616	+707	
n			9	9	9	3	9	9	3

Tabelle II:

Einzelergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit bakteriellen Infektionen des Respirationstraktes.
Erklärungen siehe Legende der Tabelle I.

Nr.	Diagnose	Leukozyt. /mm ³	Lymphozyten %	% E - RFC a	p	% EAC-RFC a	E - RFC/mm ³ a	p	EAC-RFC/mm ³
26	Infekt u. Gastritis	8700	28	31	34	-	720	790	-
43	Influenza u. NNH-Inf.	7350	68	55	64	-	2748	3198	-
52	Mumpsmeningitis	6200	34	2108	41	14	737	864	295
58	Viruspneumonie	7450	35	2607	29	40	756	1043	-
59	Herpes Corneae	5150	37	1905	24	37	457	705	-
62	Viruspneumonie	6050	28	1694	40	60	677	1016	-
71	ungekl. Virusinfekt	4850	38	1843	36	55	645	1013	-
76	Röteln	-	-	36	56	16	-	-	-
80	Entzündl. Facialispar.	8000	40	3200	33	43	1056	1376	800
85	Mumps	9950	63	6268	33	45	2068	2820	1817
86	Mononukleose	12700	57	7239	31	36	2244	2606	1085
87	Influenza	6200	86	5332	40	49	2132	2612	1173
89	Mononukleose	5900	29	1711	25	35	427	598	273
96	Lymphadenitis	7100	50	3550	26	48	923	1704	639
103	Mononukleose	17200	30	5160	27	32	1393	1651	928
$\bar{x}$				33,3	45,0	19,2	1213	1571	876
$\pm SA$				± 1878	$\pm 7,8$	$\pm 5,0$	± 765	± 882	± 504
n			14	15	15	9	14	14	8

Tabelle III:

Einzelsergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit Virusinfektionen.

Nr.	Diagnose	Leukozyten /mm ³	Lymphozyten % /mm ³	% E - RFC a	p	% EAC-RFC	E - RFC/mm ³ a	p	EAC-RFC/mm ³
23	Lymphosarkom	14900	12	1788	40	55	-	715	983
35	Ewing-Sarkom	2300	10	230	57	63	4	131	144
41	Rhabdomyosarkom	4700	33	1551	46	46	15	713	713
79	Lymphogranulomatose	6950	30	1459	26	44	10	379	642
18	ALL	4100	34	1394	51	47	-	710	655
27	ALL	12100	32	3872	40	42	-	1548	1626

Tabelle IV:

Einzelergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit malignen Erkrankungen.

Nr.	Diagnose	Leukozyten /mm ³	Lymphozyten %	% /mm ³	% E - RFC a	p	% EAC-RFC	E - RFC/mm ³ a	p	EAC-RFC/mm ³
33	Wiskott-Aldrich-Syndr.	12200	12	1464	18	10	-	263	146	-
36	Dysgammagl. (x-chrom.)	8650	70	6055	34	33	12	2058	1998	726
37	Wiskott-Aldrich-Syndr.	6450	12	774	25	21	10	193	162	77
66	Agammagl. (BRUTON)	5550	53	2941	38	60	8	1117	1764	235
68	Komb. Immundefizienz	7600	13	988	15	28	35	148	276	345
69	Transit. Hypogammagl.	11700	54	6318	22	39	28	1389	2464	1769
75	(siehe Nr. 33)	6800	22	1496	30	33	10	448	493	149
77	Agammagl. u. T-Zelldef.	9800	3	294	11	17	16	32	49	47

Tabelle V:

Einzelergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit Immundefizienzen.

Nr.	Diagnose	Leukozyten /mm ³	Lymphozyten %	Lymphozyten /mm ³	% E - RFC a	p	% EAC-RFC	E - RFC/mm ³ a	p	EAC-RFC/mm ³
3	Enterocolitis region.	11900	17	2023	59	19	-	1193	384	-
39	Purpura "Schönlein-H"	5050	25	1262	47	48	10	593	606	126
42	Purpura "Schönlein-H"	4400	40	1760	37	55	12	651	968	211
44	Morbus STILL	6450	12	1612	40	35	-	654	564	-
74	Autoimmunol. Anämie	19800	6	1188	11	16	30	130	190	356

Tabelle VI:

Einzelergebnisse der Untersuchung bei Kindern mit Autoimmunerkrankungen.

LITERATURVERZEICHNIS:

1. AIUTI, F. ; CIARLA, M.V. ; D'ASERO, C. ; D'AMELIO, R. and GAROFALO, J.A. :
Surface Markers on Lymphocytes of Patients with Infectious Diseases
Infect. Immunity 8:110 (1973)
2. AIUTI, F. ; LACAVA, V. and FIORILLI, M. :
B Lymphocytes in Agammaglobulinemia
Lancet II:761 (1972)
3. ANDERSSON, J. ; SJÖBERG, O. and MOLLER, G. :
Mitogens as Probes for Immunocyte Activation and cellular Cooperation
Transplant. Rev. 11:131 (1972)
4. ASHMAN, R.F. :
Lymphocyte Receptor Movement induced by Sheep Erythrocyte Binding
J. Immunol. 111:212 (1973)
5. BACH, J.F. :
In vitro Correlates of Cell-Mediated Immunity in the Human
Boll. Ist. Sieroter Milan 53:161 (1974)
6. BACH, J.F. ; BIOZZI, G. ; GREAVES, M.F. ; McCONNELL, I. ; MICKLEM, H.S. ; MÖLLER, E. and ZAALBERG, O.B. :
Summary of Round-Table Discussion on the Technical Aspects of the Rosette Test
Transplant. Proc. 4:335 (1972)

7. BACH, J.F. ; BAROIS, A. ; LEUASSEUR, P. and
LEBRIGAND, M. :
Evidence for a Serum Factor Secreted by the Human
Thymus
Lancet I:1056 (1972)
8. BERG, P.A. :
Infektion und Immunantwort
Die gelben Hefte; Immunbiologische Informationen
"E.v. Behring" Heft 2/1976
9. BLÄKER, F. :
Antikörpermangelsyndrome
In: Aktuelle Immunologie ; hrsg. : Medizinische
Verlagsgesellschaft Marburg; 64 (1971)
10. BOYSE, E.A. ; OLD, L.J. and STOCKERT, E. :
An Approach to the Mapping of Antigens on the Cell
Surface
Proc. Nat. Acad. Sci. 60:886 (1968)
11. BRAIN, P. and MARSTON, R.H. :
Rosette Formation by Human B and T Lymphocytes
Eur. J. Immunol. 3:6 (1973)
12. CHAPEL, H.B. :
The Effects of Papain, Trypsin and Phospholipase A
on Rosette Formation
Transplantation 15:320 (1973)
13. CHAPEL, H.M. :
Rosette Formation
Lancet II:882 (1972)

14. CHESSE, L. ; MacDERMOTT, R.P. and SCHLOSSMAN, S.F. :
Immunologic Functions of Isolated Human Lymphocyte
Subpopulations
J. Immunol. 113:1113 (1974)
15. CHIAO, J.W. ; PANTIC, V.S. and GOOD, R.A. :
Human Peripheral Lymphocytes Bearing both B-Cell
Complement Receptors and T-Cell Characteristics
for Sheep Erythrocytes Detected by a Mixed Rosette
Method
Clin. exp. Immunol. 18:483 (1974)
16. COHEN, H.J. :
Human Lymphocyte Surface Immunglobulin Capping
J. Clin. Invest. 55:84 (1975)
17. DAGUILLARD, F. :
Immunologic Significance of In Vitro Lymphocyte
Responses
Med. Clin. N. Amer. 56:293 (1972)
18. DEWAR, A.E. ; HABESHAU, J.A. ; YOUNG, G.A. ; STUART,
A.E. ; PARKER, A.C. and WILSON, C.D. :
Mixed Receptors
Lancet II:216 (1974)
19. DWYER, J.M. :
Identifying and Enumerating Human T and B
Lymphocytes
Prog. Allergy 21:178 (1976)
20. EDITORIAL
The Lymphocyte
Lancet I:409 (1973)

21. FELDMANN, M. :
 Induction of B Cell Tolerance by Antigen Specific
 T-Cell Factor
 Nature New Biology 242:82 (1973)

22. FERGUSON, A.C. ; LAWLOR, G.J. ; NEUMANN, Ch. G. ;
 Oh. W. and Stiehm, E.R. :
 Decreased Rosette-Forming Lymphocytes in Malnutrition
 and Intrauterine Growth Retardation
 J. Pediatr. 85:717 (1974)

23. GAJL-PECZALSKA, K.J. ; BIGGAR, W.D. ; PARK, B.H.
 and GOOD, R.A. :
 B Lymphocytes in DiGeorge Syndrome
 Lancet I:1344 (1972)

24. GEHRMANN, G.
 Erythrozyten (immunhämolytische und autoimmun-
 hämolytische Anämien).
 In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K.O. Vor-
 laender. Thieme, Stuttgart 1976.

25. GEIGER, H.
 Immunologische Defektsyndrome
 In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K.O. Vor-
 laender. Thieme, Stuttgart 1976.

26. GERGERLY, P. ; SZEGEDI, Gy. ; FEKETE, B. ; SZABO, G.
 and PETRANYI, Gy. :
 Rosette Formation and T-Cells
 Lancet I:883 (1973)

27. GISLER, R.H. ; STABER, F. ; RÜDE, E. and DUKOR, P. :
 Soluble Mediators of T - B Interaction
 Eur. J. Immunol. 3:650 (1973)

28. GÖTZ, H. :
Tumorimmunologie
In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K. O. Vor-
laender. Thieme, Stuttgart 1976.
29. GREAVES, M.F. ; OWEN, J.J.T. and RAFF, M.C. :
T and B Lymphocytes
hrsg. M.F. Greaves; Excerpta Medica, Amsterdam 1974.
30. GRIFONI, V. ; DEL GIACO, G.S. ; MANCONI, P.E. and
TOGNELLA, S.
Surface Immunoglobulins on Lymphocytes in Hodgkin's
Disease
Lancet I:848 (1972)
31. GUPTA, S. :
Cell Surface Markers of Human T and B Lymphocytes
New York State Journal of Medicine 76:24 (1976)
32. HEIDE, K. :
Immunologische Infektabwehr
In: Aktuelle Immunologie ; hrsg. Medizinische
Verlagsgesellschaft Marburg 48:63 (1971)
33. HEIER, H.E. :
The Influence of Mechanical Force on the Rosette
Test for Human T Lymphocytes
Scand. J. Immunol. 3:677 (1974)
34. HØIBY, N. and MATHIESEN, L. :
Pseudomonas Aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis
Acta Path. Microbiol. scand. Sect. B 82:559 (1974)

35. HOLM, G. ; PETERSON, D. ; MELLSTEDT, M. ;
HEDFORS, E. and BLOTH, B. :
Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of
Healthy Persons
Clin. exp. Immunol. 20:443 (1975)
36. HUBER, H. ; MICHELMAYR, G. ; HUBER, CH. and
FALKENSAMMER, M. :
Immunological Characterization of Lymphoproliferative
Disorders by Membrane Markers
Klin. Wschr. 54:699 (1976)
37. KOSENOW, W. :
Erkrankungen der Luftwege, der Lungen und der Ohren
In: Kinderheilkunde, hrsg. v. Harnack, G.A. 3. Aufl.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1974)
38. KOWNATZKI, E.
Antigene und Antigenität
In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K.O. Vor-
laender. Thieme, Stuttgart 1976.
39. LUCKASEN, J.R. ; SABAD, A. ; GOLTZ, R.A. and
KERSEY, I. H. :
T and B Lymphocytes in Atopic Ekzema
Arch. Dermatol. 110:375 (1974)
40. MACKANESS, G.B. :
Zelluläre Immunität
Die gelben Hefte; Immunbiologische Informationen
"E.v. Behring" Heft 4/1975
41. NORDLING, S. ; ANDERSSON, L.C. and HÄVRY, P. :
Thymus-Dependent and Thymus-Independent Lymphocyte
Separation: Relation to Exposed Sialic Acid on
Cell Surface
Science 178:1001 (1972)

42. NUSSENZWEIG, V. ; BIANCO, C. ; DUKOR, P. and EDEN, A. :
Receptors for C3 on B Lymphocytes:
Possible Role in the Immune Response
Progr. Immunol. I Ed. B. Amos; Acad. Press New York & London 73:82 (1972)
43. OWEN, F.L. and FANGER, M.W. :
Studies on the Human T-Lymphocyte Population
J. Immunol. 113:1138 (1974)
44. PERLMANN, P. ; PERLMANN, H. ; LARSSON, A. and WAHLIN, B. :
Antibody Dependent Cytolytic Effector Lymphocytes (K Cells) in Human Blood
Reticuloendothel. Soc. 17:241 (1975)
45. POLLIACK, A. ; LAMPEN, N. ; CLARKSON, B.D. and DE HAVREN, E. :
Identification of Human B and T Lymphocytes by Scanning Electron Microscopy
J. exp. Med. 138:607 (1973)
46. POSCHMANN, A. and FISCHER, K. :
Autoaggressionserkrankungen
In: Aktuelle Immunologie ; hrsg. Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg; 36 (1971)
47. POTVIN, C. ; TARPLEY, J.L. and CHRETIEN, B. :
Thymus-derived Lymphocytes in Patients with Solid Malignancies
Clin. Immunol. Immunopathol. 3:476 (1975)

48. PREUD'HOMME, J.L. and SELIGMANN, M. :
Primary Immunodeficiency with Increased Numbers
of Circulating B Lymphocytes Contrasting with
Hypogammaglobulinäemia
Lancet I:442 (1972)

49. Report of a WHO/IARC-Sponsored Workshop on Human
B and T Cells, London, 15-17 July 1974
Identification, Enumeration, and Isolation of B
and T Lymphocytes from Human Peripheral Blood
Scand. J. Immunol. 3:521 (1974)

50. RESCH, K.
Zelluläre Immunreaktionen
In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K.O. Vor-
laender. Thieme, Stuttgart 1976.

51. RESCH, K.
Zytologische Methoden
In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K.O. Vor-
laender. Thieme, Stuttgart 1976.

52. RICHTER, M. and ALGOM, D. :
The Heterogenity of Lymphocytes
Med. Clin. N. Amer. 56:305 (1972)

53. RITZMANN, S.E. ; DANIELS, J.C. ; SAKA, H. and
BEATHARD, G.A. :
The Lymphocyte in Immunobiology
Ann. Allergy 31:109 (1973)

54. ROELANTS, G.E. ; RYDEN, A. ; HÄGG, L.-B. and
LOOR, F. :
Active Synthesis of Immunoglobulin Receptors for
Antigen by T Lymphocytes
Nature 247-106 (1974)

55. ROWLANDS, D.T. and DANIELE, R.P. :
Surface Receptors in the Immune Response
New Engl. J. Med. 293:26 (1975)
56. SCHÖPF, E.
Störung zellvermittelter Immunreaktionen bei
Neurodermitis atopica
Dermatologica 149:210 (1974)
57. SEILER, F.R. ; SEDLACEK, M.M. ; KANZY, E.J.
and LANG, W. :
Über die Brauchbarkeit immunologischer Nachweis-
methoden zur Differenzierung funktionell verschie-
dener Lymphozyten: Spontanrosetten, Komplement-
rezeptor-Rosetten und Immunglobulinrezeptoren
Behring Inst. Mitt. 52:26 (1972)
58. SIEGEL, I. :
Mechanismus of Rosette Formation
Brit. Med. J. 4:297 (1972)
59. SIEGEL, I. ; GRIECO, M.M. and GUPTA, S. :
Subpopulations of B Lymphocytes in Human Tonsils
and Peripheral Blood
Lancet II:215 (1974)
60. SHELDON, P.J. ; PAPAMICHAIL, M. ; HEMSTED, E.M.
and MOLBOROW, E.J. :
Thymic Origin of Atypical Lymphoid Cells in
Infectious Mononucleosis
Lancet I:1153 (1973)

61. STEEL, C.M. ; EVANS, J. and SMITH, M.A. :
The Sheep-Cell Rosette Test on Human Peripheral
Blood Lymphocytes: An Analysis of Some Variable
Factors in the Technique
Brit. J. Hämatol. 28:245 (1974)
62. SMITH, R.W. ; TERRY, W.D. ; BUELL, D.N. and
SELL, K.W. :
An Antigenic Marker for Human Thymic Lymphocytes
J. Immunol. 110:884 (1973)
63. TACHIBANA, T. and ISHIKAWA, M. :
A New Mikro-method for Quantitation of Human
T- and B-Lymphocytes
Japan. J. exp. Med. 43:227 (1973)
64. TAKADA, A. and TAKADA, Y. :
T and B Lymphocytes
Lancet II:216 (1974)
65. TALAL, N. ; SYLVESTER, R.A. ; DANIELS, T.E.,
GREENSPAN, J.S. and WILLIAMS, R.C. JR
T and B Lymphocytes in Peripheral Blood and
Tissue Lesions in Sjörgens Syndrome
J. Clin. Invest. 53:180 (1974)
66. UNANUE, E.R. ; ENGERS, H.D. and KARNOVSKY, M.J. :
Antigen Receptors on Lymphocytes
Fed. Proc. 32:44 (1973)
67. VISCHER, T.L. :
Mitogenic Factors Produced by Lymphocyte Activation:
Effect on T and B Lymphocytes
J. Immunol. 109:401 (1972)

68. VORLAENDER, K.O. :
Gefäßbindegewebe (Kollagenkrankheiten)
In: Praxis der Immunologie, hrsg. von K.O. Vorlaender. Thieme, Stuttgart 1976.
69. WALDMANN, T.A. ; STROBER, W. and BLAESE, R.M. :
Immunodeficiency Disease and Malignancy
Ann. Int. Med. 77:605
70. WEBSTER, A.D.B. and ASHERSON, G.L. :
Identification and Function of T Cells in the
Peripheral Blood of Patients with Hypogammaglobulinemia
Clin. exp. Immunol. 18:499 (1974)
71. WEHINGER, H. and Karitzky, D. :
Lymphozyten-Subpopulationen und Immunglobuline
vor, während und nach cytostatischer Therapie
bei akuter Leukämie (ALL) des Kindes
Klin. Pädiat. 189:234 (1977)
72. WELLS, J.V. and FUDENBERG, H.H. :
Management of Patients with Primary Immune
Deficiency Syndromes
Aus. N.Z.J. Med. 4:396 (1974)
73. WILLIAMS, R.C. and MESSNER, R.P. :
Alterations in T and B Cells in Human Disease
States
Ann. Rev. Med. 26:181 (1975)
74. WIOLAND, M. ; SABOLOVIC, D. and BURG, D. :
Electrophoretic Mobilities of T and B Cells
Nat. New Biol. 237:274 (1972)

75. WOODY, J.N. and SELL, K.W. :
Characteristics of the 'Active Rosette Test'
I. Technical Considerations of the Test and
Comments
J. Immunol. Meth. 8:331 (1975)
76. WYBRAN, J. :
The Human Rosette Forming Cell as a Marker of
a Population of Thymus Derived Cells
J. Clin. Invest. 51:2537 (1972)
77. WYBRAN, J. ; CARR, M.C. and FUDENBERG, H.H. :
Effect of Serum on Human Rosette-Forming Cells
in Fetuses and Adult Blood
Clin. Immunol. Immunopath. 1:408 (1973)
78. WYBRAN, J. ; LEVIN, A.S. ; SPITTER, L.E. and
FUDENBERG, H.H. :
Rosette-Forming Cells, Immunologic Deficiency
Diseases and Transfer Factor
N. Engl. J. Med. 288:710 (1973)
79. WYBRAN, J. and FUDENBERG, H.H. :
Thymus-Derived Rosette-Forming Cells in Various
Human Disease States: Cancer, Lymphoma, Bacterial
and Viral Infections and other Diseases
J. Clin. Invest. 52:1026 (1973)
80. WYBRAN, J. and FUDENBERG, H.H. :
Thymus-Derived Rosette-Forming Cells
New Engl. J. Med. 288:1072 (1973)

81. WYBRAN, J. :
How Clinically useful is T and B Cell Quantitation
Ann. Int. Med. 80:765 (1974)
82. YU, D.T.Y. ; PETER, J.B. ; PAULUS, H.E. and
NIES, K. :
Human Lymphocyte Subpopulations: Study of T and
B Cells and Their Density Distribution
Clin. Immunol. Immunopathol. 2:333 (1974)
83. YU, D.T.Y. :
Human Lymphocyte Subpopulation: Early and Late
Rosettes
J. Immunol. 115:91 (1975)
84. ZEILLER, K. ; PASCHER, G. ; WAGNER, G. ; LIEBICH,
H.G. ; HOLZBERG, E. and HANNIG, K. :
Distinct Subpopulations of Thymus-Dependent
Lymphocytes
Immunol. 26:995 (1974)

Herrn Prof.Dr. W.Marget danke ich für die
Überlassung des Themas.

Den Mitarbeitern der Universitäts-Kinderklinik
München gilt mein Dank für die Hilfe während
des experimentellen Teiles der Arbeit, Herrn
Dr. B.Belohradsky für seine freundliche
Beratung und Unterstützung.

Lebenslauf:

Als Sohn des Volksschullehrers Willi Modrow und seiner Frau Ilse geb. Demmer wurde ich am 3. November 1948 in Blaichach im Allgäu geboren. Nach dem Besuch der Volksschule Sonthofen von 1954 bis 1958 trat ich in das naturwissenschaftliche Gymnasium in Oberstdorf ein. 1967 schloß ich dort mit dem Abitur ab und begann eine dreijährige Militärdienstzeit.

Im Wintersemester 1970/71 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München auf. Hier legte ich im Oktober 1971 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im April 1973 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Juni 1977 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen, die Approbation als Arzt wurde mir im August 1978 erteilt.

